

THESE PRESENTEE EN VUE D'OBTENIR
LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

**REPRESSION ET INHIBITION CATABOLIQUE
DE LA
MALTOZYMASE ET DES ENZYMES RESPIRATOIRES
CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE
ET CARLSBERGENSIS**

Présentée par

Claudine Ramos-Jeunehomme

Soutenue le 5 janvier 1973

COMPOSITION DU JURY :

M. R. GAY Président

MM. CH. ALAIS Examineurs

CH. A. MASSCHELEIN

P. GALZY

THESE PRESENTEE EN VUE D'OBTENIR
LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

**REPRESSION ET INHIBITION CATABOLIQUE
DE LA
MALTOZYMASE ET DES ENZYMES RESPIRATOIRES
CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE
ET CARLSBERGENSIS**

Présentée par

Claudine Ramos-Jeunehomme

Soutenue le 5 janvier 1973

COMPOSITION DU JURY :

M. R. GAY Président

MM. CH. ALAIS Examineurs

CH. A. MASSCHELEIN

P. GALZY

Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41555024_0018

Que Monsieur le Professeur R.Gay soit assuré de notre reconnaissance pour nous avoir autorisé à présenter cette thèse et pour avoir bien voulu accepter la présidence du jury.

Nous remercions Monsieur A.Devreux, Professeur au C.E.R.I.A de l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à ce travail.

Toute notre reconnaissance va à Monsieur Ch.A.Masschelein, Professeur au C.E.R.I.A qui a dirigé ce travail. Ses conseils, ses encouragements, son enthousiasme et les nombreuses années de travail en commun nous ont été des plus précieux pour la réalisation de cette thèse..

Nos remerciements s'adressent à tout le personnel du Service des Fermentations du C.E.R.I.A pour l'excellente ambiance de travail. La collaboration de Monsieur J.Dupont a été très fructueuse pour les essais de micromanipulation et nous l'en remercions vivement.

Nous remercions également Monsieur F.Hilger de l'Institut Agronomique de Gembloux et Fernando mon mari de l'Institut de Recherches du C.E.R.I.A pour les nombreuses discussions qui ont grandement contribué à la rédaction de ce travail.

Toute notre gratitude va enfin à Monsieur G.Chiltz, Directeur Général du C.E.R.I.A et à Monsieur J.M Piérard, Directeur de l' I.I.F-I.M.C pour les facilités qu'ils ont bien voulu accorder en vue de l'accomplissement de ce travail.

TABLE DES MATIERES.

	pages
1- INTRODUCTION	1
2- OBJET DU TRAVAIL	22
3- TECHNIQUES EXPERIMENTALES	23
3.1- Souches et milieux de culture	
3.1.1- souches de levures	
3.1.2- milieux de culture	
3.1.3- techniques de culture.....	25
3.2- Détermination de l'activité enzymatique	
3.2.1 - méthodes de préparation de l'extrait	
3.2.1.1- perméabilisation par congélations	
3.2.1.2- extrait à l'aide d'ultra-sons	
3.2.1.3- extrait par broyage	26
3.2.1.4- perméabilisation à la nystatine	
3.2.1.5- extrait par éclatement des protoplastes	
3.2.1.6- détermination des protéines dans l'extrait	
3.2.2- Dosages enzymatiques	27
3.2.2.1- mesure du pouvoir respiratoire	
3.2.2.2- mesure de la somme perméase de maltose + alphaglucosidase	
3.2.2.3- mesure de l'alphaglucosidase	28
3.2.2.4- mesure de l'isocitritase	
3.2.2.5- mesure de la malate synthase	30
3.2.2.6- mesure de la succinique déshydrogénase	31
3.2.2.7- mesure du maltose dans le milieu de croiss.	
3.3- Méthodes génétiques	32
3.3.1- Milieu de présporulation	
3.3.2- Milieu de sporulation	

3.3.3-	Test de sporulation	
3.3.4-	Isolement des ascospores	
3.3.4.1-	isolement à l'aide de la micromanipulation	
3.3.4.2-	isolement en masse des ascospores	33
3.3.4.3-	détermination du signe des ascospores	
4-	RESULTATS EXPERIMENTAUX	35
4.1-	CHAPITRE 1- REPRESSION CATABOLIQUE DU METABOLISME OXYDATIF CHEZ SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS.	
4.1.1-	Influence de la souche de levure sur l'apparition de la diauxie	
4.1.2-	Influence de la nature du substrat carboné sur l'apparition de la diauxie	36
4.1.3-	Influence de la nature du substrat carboné sur les variations de la capacité respiratoire au cours de la croissance	38
4.1.3.1-	croissance sur glucose 0,15%	
4.1.3.2-	croissance sur maltose 0,15%	
4.1.3.3-	croissance sur maltose 2%	40
4.1.4-	Influence de la nature du substrat carboné sur la synthèse des enzymes du shunt glyoxylique et de la succinique déshydrogénase	
4.1.5-	Conclusions et discussion de la première partie	42
4.2-	CHAPITRE 2- REPRESSION DE LA MALTOZYMASE CHEZ SACCHARO- MYCES CEREVISIAE ET CARLSBERGENSIS.....	46
4.2.1-	Répression catabolique de la maltozymase chez les différentes souches de S.cerevisiae et carlsbergensis	
4.2.1.1-	reproductibilité des mesures	48
4.2.1.2-	évolution de la maltozymase	50
4.2.1.3-	évolution de l'alphaglucosidase	53
4.2.2-	Influence de la présence de l'inducteur sur la répression catabolique de la maltozymase	57

4.2.3-	Influence du rapport maltose /glucose sur la répression de la maltozymase	58
4.2.4-	Répression de la maltozymase par l'éthanol	59
4.2.5-	Corrélation entre répression de la maltozymase et répression des enzymes respiratoires par le glucose	60
4.2.5.1-	évolution de la maltozymase au cours de la croissance sur glucose 0,15%	61
4.2.5.2-	évolution de la maltozymase en croissance sur acétate 0,7%	63
4.2.5.3-	corrélation entre répression des enzymes respiratoires et de la maltozymase chez les différentes souches de levures étudiées	64
4.2.6-	Conclusions et discussion de la deuxième partie	66
4.3-	CHAPITRE 5- ESSAI DE DEFLOIDISATION DES LEVURES INDUS-TRIELLES	70
4.3.1-	Taux de sporulation des levures de notre collection	72
4.3.2-	Dissection des asques à 4 spores des levures 101 et 180 à l'aide de la micromanipulation-Etude des ségrégeants	74
4.3.3-	Isolement en masse des ségrégeants	
	levure 101	
	levure 180	78
	levure 185	79
	levure 185	
4.3.4-	Analyse génétique des ségrégeants possédant un signe	
4.3.5-	Conclusions et discussion de la troisième partie	82

5- CONCLUSIONS GENERALES

6- BIBLIOGRAPHIE

1- INTRODUCTION.

Depuis les travaux de Hall (1951), Barton Wright (1953), Mac Farlane (1953) et de Gjertsen (1953-1955), nous savons que 90% de l'extrait du m^oût de brasserie est constitué de sucres. La composition en sucres d'un m^oût de malt pur est donné dans le tableau suivant :

composition des hydrates de carbone d'un m ^o ût.	teneur en gr / 100gr de matière sèche.
fructose + glucose	8,2
saccharose	4,2
maltose	41,7
maltotriose	14,2
maltotétraose	5,8
dextrine	15,2
hydrate de carbone totaux	89,3
hydrates de carbone fermentescibles	68,3
hydrates de carbone non fermentescibles	21

Les hydrates de carbone fermentescibles sont suivant l'ordre de leur utilisation par la levure de brasserie : le glucose, le fructose, le saccharose, le maltose, le maltotriose en chaîne droite et le maltotétraose droit. De petites quantités de sucres branchés de faibles poids moléculaires ont été trouvées dans la bière. Ce sont l'isomaltose contenant une liaison alpha 1-6

entre les deux glucoses à la place d'une liaison alpha 1-4, le panose trisaccharide avec une liaison alpha 1-4 et une liaison alpha 1-6, le tétrasaccharide branché avec deux liaisons alpha 1-4 et une liaison alpha 1-6. L'alphaglucosidase de la levure *S.cerevisiae* ou *carlbergensis* peut hydrolyser la liaison alpha 1-4, mais pas la liaison alpha 1-6. L'isomaltose ainsi que le panose et le tétrasaccharide branché feront donc parties des sucres non fermentescibles (Gjertsen 1955- Hopkins 1957-Niefind 1970).

Parmi les sucres fermentescibles comme l'indiquent les travaux de Barton wright (1951), Phillips (1955) et de Harris-Millin (1963) seuls le glucose et le fructose sont des substrats directs pour l'hexokinase et les enzymes de la fermentation. Ces deux hydrates de carbone entrent par diffusion facilitée dans la levure. Deux mécanismes, en effet, ont été proposés pour l'entrée des sucres chez la levure :

1°/ un transport par diffusion facilitée pour les monosaccharides (Sols 1956- Burger et al 1959- Cirillo 1960).

2°/ un transport actif au moyen de perméases spécifiques pour le maltose et le maltotriose (Harris et Thompson 1960).

La diffusion facilitée du glucose et du fructose se caractérise par une même concentration du substrat de part et d'autre de la paroi cellulaire, par une spécificité de la rentrée du sucre, par un transport dépendant du métabolisme de la cellule, par une compétition de certains monosaccharides entr'eux pour la rentrée. Ce mécanisme a été proposé par Sols (1956), Burger (1959 et Cirillo (1960-1961) en étudiant la rentrée des monosaccharides non métabolisables arabinose et sorbose ou du galactose chez des levures non adaptées. L'action des inhibiteurs comme le 6 fluoro D glucose ou le 2 deoxyglucose, composés inhibiteurs de la fermentation du

glucose et du fructose (Blackley et Boyer 1955) en cellules entières et sans action sur la fermentation de ces sucres en extrait et sur l'hexokinase est une autre preuve de l'existence d'une perméase pour les monosaccharides. D'autre part du glucose libre a pu être mesuré lorsque la fermentation est inhibée au niveau de la triose phosphate déshydrogénase par le monoiodoacétate. Cette diffusion facilitée est indépendante de l'hexokinase (Blackley 1955- Cirillo 1961), l'hexose pénètre donc à l'état libre dans la levure pour être ensuite phosphorylé par l'hexokinase. Ce transport est régulé par un intermédiaire de la fermentation : le glucose 6 phosphate (Cirillo 1963- Heredia 1968 et Kotyk 1969).

Le saccharose étant hydrolysé par l'invertase à l'extérieur de la cellule de levure, peut également être considéré comme un substrat direct pour les enzymes de la fermentation. Les travaux d'Ottolenghi (1959), Burger (1961), Sutton (1962) et de Gascon (1968) ont montré que 70 à 90% de l'invertase se trouve liée à la membrane cellulaire sous la forme d'une glycoprotéine, 10 à 30% se retrouvent cependant sous la forme d'enzyme interne non liée au mannane et de poids moléculaire plus faible. Les similitudes d'activité spécifique, de pH optimum, de Km suggèrent que l'enzyme interne serait le précurseur de l'invertase externe (Gascon 1968).

Quant au maltose et au maltotriose, une adaptation à l'utilisation de ces sucres a lieu au cours de la fermentation. Depuis les travaux de Robertson et Halvorson (1957), De la Fuente et Sols (1962) et de Sutton et Lampen (1962), il est bien connu que la maltozymase est formée de deux enzymes : une perméase spécifique du maltose, responsable du transport actif de ce substrat et d'une alphaglucosidase qui hydrolyse le maltose intracellulaire en deux molécules de glucose. Le maltotriose pénètre par une autre perméase pour être ensuite transformé en glucose par l'alphaglu-

cosidase. Harris et Thompson (1960-1961) ont étudié les perméases du maltose et du maltotriose en se plaçant à pH 8,5. Dans ces conditions, l'alphagluco. sidase est inactive. Harris et Thompson (1960-1961) ont pu mesuré ainsi une concentration à l'intérieur de la cellule du maltose de 15 fois et du maltotriose de 3 à 5 fois plus élevée que celle du milieu extérieur. Les propriétés de ces perméases se rapprochent ainsi de celles des perméases décrites par Cohen et Monod en 1957. Ce sont l'intervention d'une protéine spécialisée, leur stéréospécificité, la spécialisation fonctionnelle les distinguant des enzymes métaboliques impliqués dans l'utilisation des hydrates de carbone. Ces perméases sont sous contrôle génétique, une mutation peut atteindre la perméase sans diminuer l'activité des autres enzymes du métabolisme. Ces perméases sont de nature adaptative et nécessitent l'énergie de la cellule pour leur fonctionnement, elles sont par conséquent inhibées par les inhibiteurs du métabolisme comme le 2-4 dinitrophénol, l'azide de sodium ou le fluorure de sodium. La vitesse de fermentation du maltose et du maltotriose est différente suivant les souches de levures qu'ils s'agissent de *S.cerevisiae* ou *carlbergensis* (Harris 1960-1966)

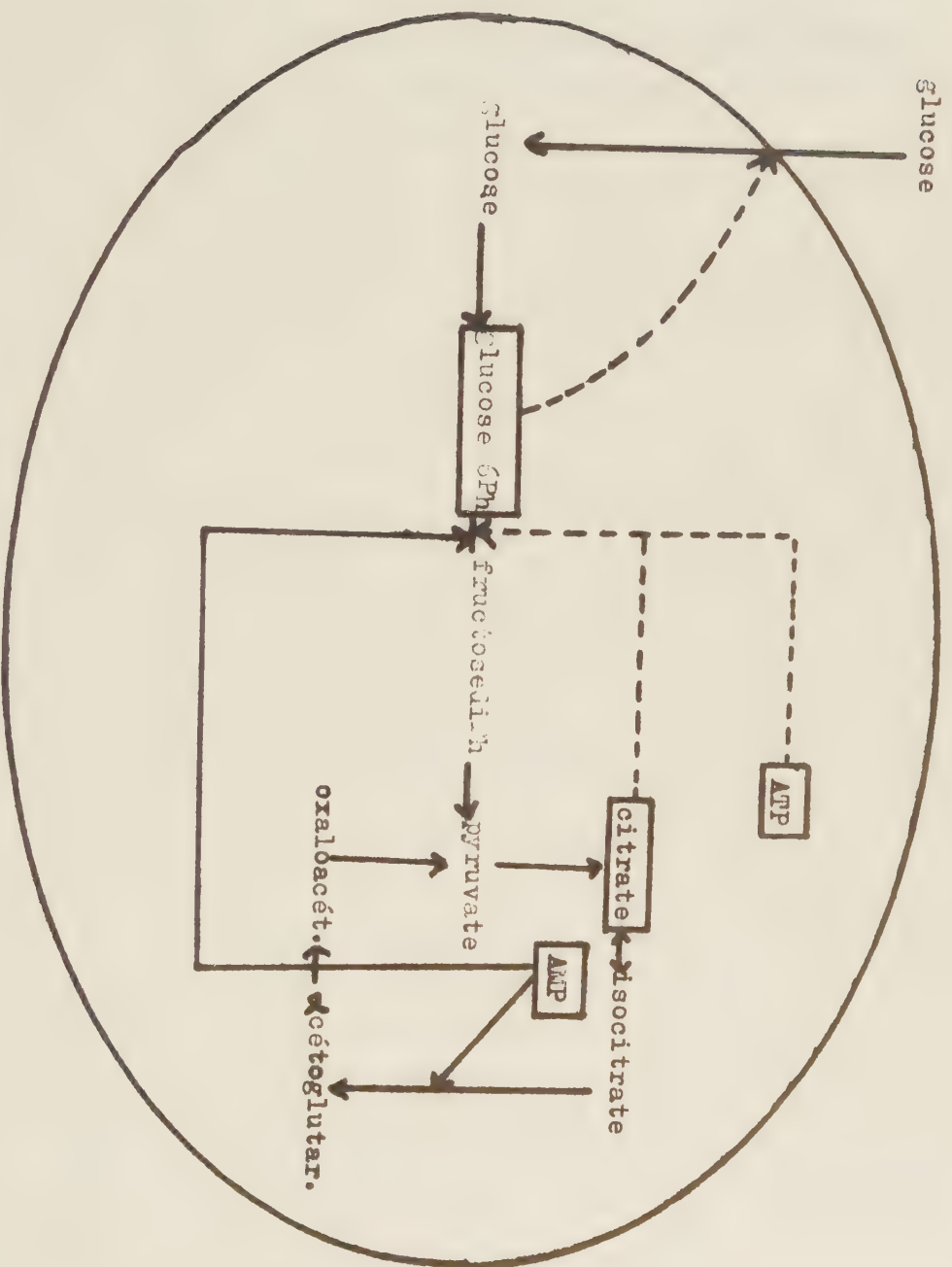
L'alphagluco. sidase hydrolyserait à la fois le maltotriose et le maltose en glucose. En effet, l'activité de la maltase n'a pu être séparée de celle de la maltotriase par Cook et Phillips (1957) que ce soit par chromatographie sur alumine ou par électrophorèse. Gilliland a montré (1970) que les levures super atténuantes c'est-à-dire utilisant des sucres plus complexes que le maltotriose possèdent une glucamylase différente de l'alpha glucosidase. Cette glucamylase hydrolyse les liaisons alpha 1-4 des hydrates de carbone linéaire plus complexes que les trisaccharides. La synthèse de l'alphagluco. sidase est contrôlée par six gènes non

liés. (Halvorson et al 1963) Les alphaglucosidases ainsi produites se caractérisent par des propriétés électrophorétiques identiques. Les courbes d'inactivation par la chaleur, de neutralisation par un antisérum ainsi que l'affinité pour le maltose sont également les mêmes pour ces alphaglucosidases. Celles-ci ont un pH optimum d'activité proche du pH intracellulaire (6,8) et sont inhibées par les substances complexant les groupements sulfhydrils et par les amines.

Dans un moût de brasserie, l'utilisation des hydrates de carbone est séquentielle dans l'ordre glucose, maltose et maltotriose. La présence de glucose réprime la perméase du maltose et celle du maltotriose ainsi que l'alphaglucosidase. Le maltose réprime la perméase du maltotriose (Harris 1963-Millin 1963).

Deux systèmes de régulation appelés Effet Pasteur et Contr'Effet Pasteur interviennent dans l'utilisation des hydrates de carbone par la levure. L'Effet Pasteur se manifeste lorsque des levures en fermentation se trouvent en présence d'oxygène. Il se traduit par une diminution des enzymes de la glycolyse et par une utilisation plus lente du glucose en tant que substrat carboné. Pasteur avait le premier observé ce phénomène en 1876. Le Contr' Effet Pasteur ou Effet Crabtree se traduit par une utilisation du glucose par fermentation en culture aérobie, lorsque la concentration est supérieure à $6 \cdot 10^{-3} M$. Toutes les levures ne sont pas sensibles à l'Effet Crabtree, mais tous les saccharomycètes le sont. Différentes théories ont été proposées pour expliquer l'Effet Pasteur. Ce phénomène pourrait s'expliquer suivant Jols (1967) par une série d'activations et de rétroinhibitions enzymatiques qui ajustent la vitesse d'utilisation du glucose suivant les besoins en énergies et en intermédiaires de la cellule.

1°/ Lorsque le niveau énergétique de la cellule est élevé, notam-



— activation

- - - rétroinhibition

Figure n°1 - Régulation de l'Effet Pasteur suivant SOLIS

ment en présence d'oxygène, il y aura formation de beaucoup d'ATP et de peu d'AMP. Dans ce cas, l'isocitrique déshydrogénase est peu active par manque d'AMP, celui-ci étant un activateur de cette réaction et le citrate s'accumule.

2°/ Le citrate et l'ATP produites en grande quantité inhibent la phosphofructokinase, première étape irréversible de la glycolyse.

3°/ Le glucose 6 phosphate s'accumule, à cause de l'inhibition de la phosphofructokinase et inhibe partiellement la vitesse d'entrée du glucose dans la cellule (voir figure 1).

Cette diminution dans la vitesse d'entrée du glucose se répercute sur son métabolisme. Nous assistons alors à un changement dans la suite des réactions d'utilisation du glucose. Le pyruvate n'est plus décarboxylé en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase, mais se transforme en acétyl CoA par la pyruvate oxydase et rentre dans le cycle de krebs. Holzer (1961) a montré que l'affinité de la pyruvate oxydase pour le pyruvate est beaucoup plus élevée que l'affinité pour la pyruvate décarboxylase. Une diminution de la concentration cellulaire en pyruvate comme il s'en produit ici suite à la vitesse d'entrée du glucose plus lente influencera surtout l'activité de la pyruvate décarboxylase et donc la fermentation. D'autres théories plus anciennes avaient été proposées pour expliquer l'Effet Pasteur. Cet Effet serait du :

a/ à une compétition entre la respiration et la fermentation pour un intermédiaire commun : l'adénosine diphosphate et le phosphate inorganique. (Lynen 1944- Johnson 1941)

b/ à l'inaccessibilité de l'adénosine triphosphate produite dans les mitochondries par la respiration pour les enzymes de la glycolyse, enzymes solubles se trouvant dans le cytoplasme.

Le Contr'Effet Pasteur ou Effet Crabtree se traduit par une utilisation du glucose par fermentation en culture aérobie lorsque la concentration en sucre est supérieure à $6.10^{-3}M$

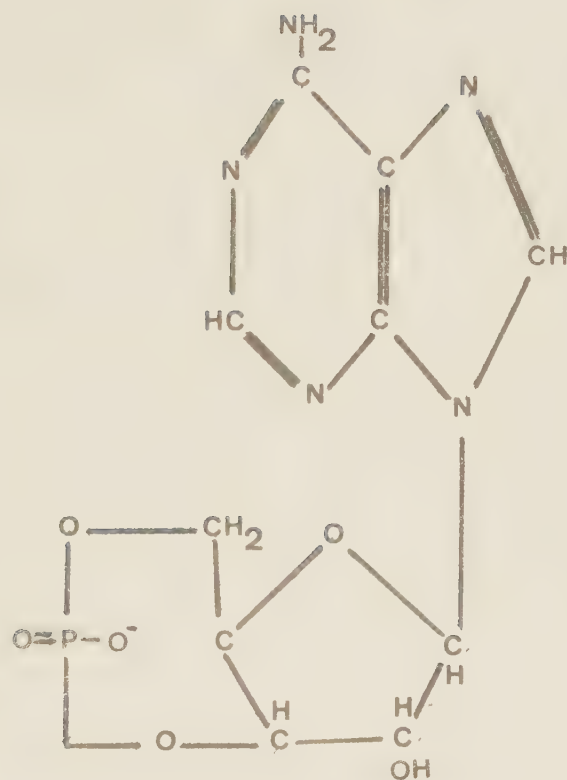


Figure 2 3.5 AMP cyclique

(De Deken 1966). Ce phénomène étudié par Swanson et Clifton (1948), Ephrussi et al (1956) et Eaton et al (1957) ressemble à celui observé par Crabtree dans les cellules tumorales : dans ces cellules, il y a inhibition de la respiration endogène lorsqu'on ajoute du glucose. Le sucre est fermenté avec accumulation d'éthanol. Après disparition du glucose, l'éthanol est oxydé jusqu'au stade CO_2 et H_2O . Le glucose réprime la synthèse des enzymes du cycle de Krebs, du shunt glyoxylique ainsi que de celles effectuant le transport d'électrons.

L'effet répressur du glucose sur de nombreuses enzymes a été généralisé par Magasanik (1961), il a été donné au phénomène le nom de répression catabolique. Cet effet du glucose avait été découvert en 1942 par Epps et Gale : action du glucose sur les désaminases des aminoacides et par Monod en 1947 : action du glucose sur les enzymes permettant la dégradation d'autres sucres. La répression catabolique est surtout active sur des enzymes inductibles, mais l'inductibilité des enzymes n'est pas une raison nécessaire, ni suffisante. En effet, tous les enzymes inductibles ne sont pas sensibles à la répression catabolique : par exemple les décarboxylases des aminoacides sont insensibles. Certaines enzymes constitutifs : invertase et bêtaglucosidase sont sensibles au glucose (Ullmann 1971). La répression catabolique est surtout importante dans des conditions où le sucre est métabolisé rapidement tandis que la source d'azote l'est lentement. L'accumulation de métabolites intermédiaires est favorisée, l'agent de régulation ne serait donc pas le sucre lui-même, mais un métabolite formé au cours de sa dégradation (Ullmann 1971). Le 3-5 AMP cyclique (figure 2) semble jouer un rôle important dans la régulation de la répression catabolique (Ullmann et Monod 1968- Perlman et Pastan 1969). Les arguments en faveur du rôle du 3-5 AMP cyclique sont multiples : 1°/ le 3-5 AMP cyclique est capable de lever la

répression catabolique pour les systèmes sensibles à cette répression.
 2°/ le 3-5 AMP cyclique est sans action sur les systèmes non soumis à la répression catabolique.

3°/ le 3-5 AMP cyclique est formé par l'adényl cyclase. Un mutant incapable de synthétiser cette enzyme et donc de former le 3-5 AMP cyclique ne peut croître sur les sucres dont le métabolisme est sensible à la répression catabolique, cela après répression de ces enzymes par le glucose. Le taux intracellulaire en AMP cyclique serait contrôlé par deux phénomènes : d'une part la phosphodiesterase transformerait le 3-5 AMP cyclique en 5'AMP, produit inactif, d'autre part le 3-5 AMP cyclique serait excrété dans le milieu dans certaines conditions (Aboud et Burger 1971). Il n'est cependant pas prouvé que seule la concentration en 3-5 AMP cyclique détermine le taux de répression catabolique. En effet, dans des conditions où le degré de répression varie de 1 à 100, le taux intracellulaire en AMP cyclique lui ne varie que de 1 à 5 au maximum (Ullmann 1971).

D'autres métabolites encore inconnus pourraient également jouer un rôle antagoniste de l'AMP cyclique par exemple. Le récepteur intracellulaire de l'AMP cyclique est une protéine qui a pu être isolée et à laquelle on a donné le nom de protéine CAP. Un mutant incapable de synthétiser la protéine CAP, présente les mêmes caractéristiques que le mutant adényl cyclase négatif (Schwarts et Beckwith 1970). Chez E.Coli, la répression catabolique agirait au niveau du promoteur, c'est-à-dire à l'endroit où commence la transcription. Un mutant portant une délétion dans la zone du promoteur est insensible à la répression catabolique. Celle-ci entraînerait une diminution du taux de synthèse du RNA messenger, ainsi que la synthèse de messagers incomplets. Chez S. carlbergensis (Van Wijk 1968-1969), la répression catabolique de l'alphaglucosidase agirait à la fois au niveau de la transcription et de la lecture de RNA messenger dans les

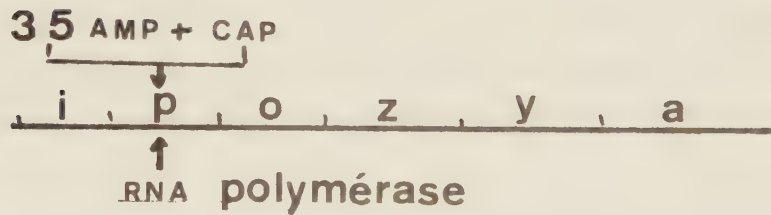
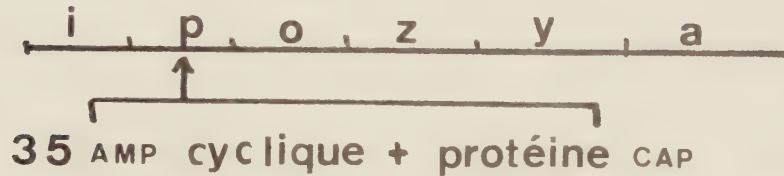


i = gène de régulation

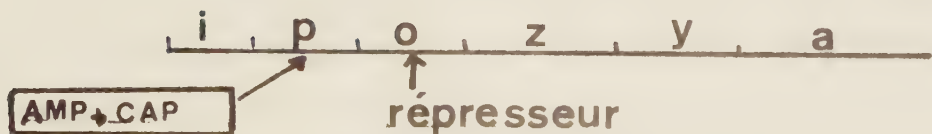
p = promoteur

o = opérateur

z, y, a = gènes de structure



Synthèse du RNA messager



La RNA polymérase ne peut se combiner avec le promoteur, il n'y a pas de synthèse du RNA messager.

Figure 3 : régulation de la répression catabolique par le 3.5 AMP cyclique

ribosomes. Zubay et al (1970) montrent que dans un système " in vitro la synthèse de la bêtaglucosidase est augmentée de 20 fois par l'AMP cyclique 10^{-4} M conjointement avec une ou plusieurs protéines spécifiques. Le 3-5 AMP cyclique agit à la manière d'un inducteur pléiotrope, il déréprime simultanément tous les systèmes soumis à la répression catabolique, sa régulation serait positive. La transcription à partir du promoteur pour les opérons sensibles à la répression catabolique ne se fait qu'en présence de 3-5 AMP cyclique tandis que pour les opérons insensibles à cette répression, la transcription ne dépend pas de la présence d'AMP cyclique (Zubay et Lederman 1969). L'AMP cyclique se combine avec la protéine CAP et active le promoteur. La synthèse du RNA messager commence grâce à la RNA polymérase. Si le répresseur s'attache à l'opérateur la transcription ne se fait pas même en présence d'AMP cyclique et de la protéine CAP (voir figure 3).

Si la plupart des travaux ont été réalisés chez les bactéries , surtout chez E.Coli, il n'en reste pas moins vrai que quelques observations intéressantes ont été faites dans le cas de la levure. Cheung (1966) indique la présence d'AMP cyclique chez *S.carlsbergensis*. Van Wijk et Konijn (1971) ont montré que la levure en croissance sur glucose contient six fois moins de 3-5 AMP cyclique que la levure en croissance sur galactose.

La répression catabolique s'exprime pour ces deux substrats par une différence d'activité qui est de 10 fois pour l'alphaglucosidase et de six fois pour la succinique déshydrogénase. Dans ces deux conditions de croissance le contenu de la levure en phosphodiesterase est le même (Speziali-Van Wijk 1971). SY et Richter (1972) montrent chez *S. fragilis* que le contenu intracellulaire en AMP cyclique et en adényl dyclase varie au cours de la croissance sur glucose 0,15% avec une concentration maximum en fin de croissance ce qui correspond en fait à la dérepression des enzymes

respiratoires et du shunt glyoxylique. De fortes concentrations en glucose et des conditions anaérobies diminuent la formation d'AMP cyclique.

Les hypothèses^s récentes sur la répression catabolique qui font intervenir l'AMP cyclique expliquent un arrêt de synthèse de l'enzyme, mais pas une inactivation de l'enzyme préformée. Trois mécanismes règlent (Paigen et Williams 1970) la synthèse et l'activité des enzymes intervenant dans le catabolisme. Ce sont la répression catabolique, la répression transitoire et l'inhibition catabolique. La répression catabolique est la réduction ou l'arrêt de la synthèse de certaines enzymes en présence de glucose ou d'une autre source de carbone facilement métabolisable. La répression transitoire est une répression très intense immédiatement l'addition du glucose qui ne se manifeste que pendant un doublement cellulaire. Répression catabolique et répression transitoire sont deux phénomènes étroitement liés. En effet, un mutant portant une délétion dans la zone du promoteur est à la fois insensible aux deux types de répression. De plus le 3-5 AMP cyclique supprime à la fois répression catabolique et transitoire (Yudkin 1971). L'inhibition catabolique est un contrôle exercé par le glucose sur l'activité de l'enzyme plutôt que sur sa formation, contrôle analogue à la rétroinhibition pour les chemins biosynthétiques. L'inhibition catabolique s'exerce soit sur la perméase, soit sur la première enzyme de la chaîne. L'inhibition catabolique par le glucose a été décrite pour la perméase du maltose (Görts 1969), pour l'isocitritase (Chapman 1968), pour la malate déshydrogénase cytoplasmique (Ferguson et al 1967- Van Wijk 1972) et pour la 1-6 diphosphatase (Gancedo 1971). La répression catabolique explique l'arrêt ou la synthèse réduite de l'alphaglucosidase, de nombreuses enzymes du cycle de Krebs et de certaines enzymes de la chaîne respiratoire.

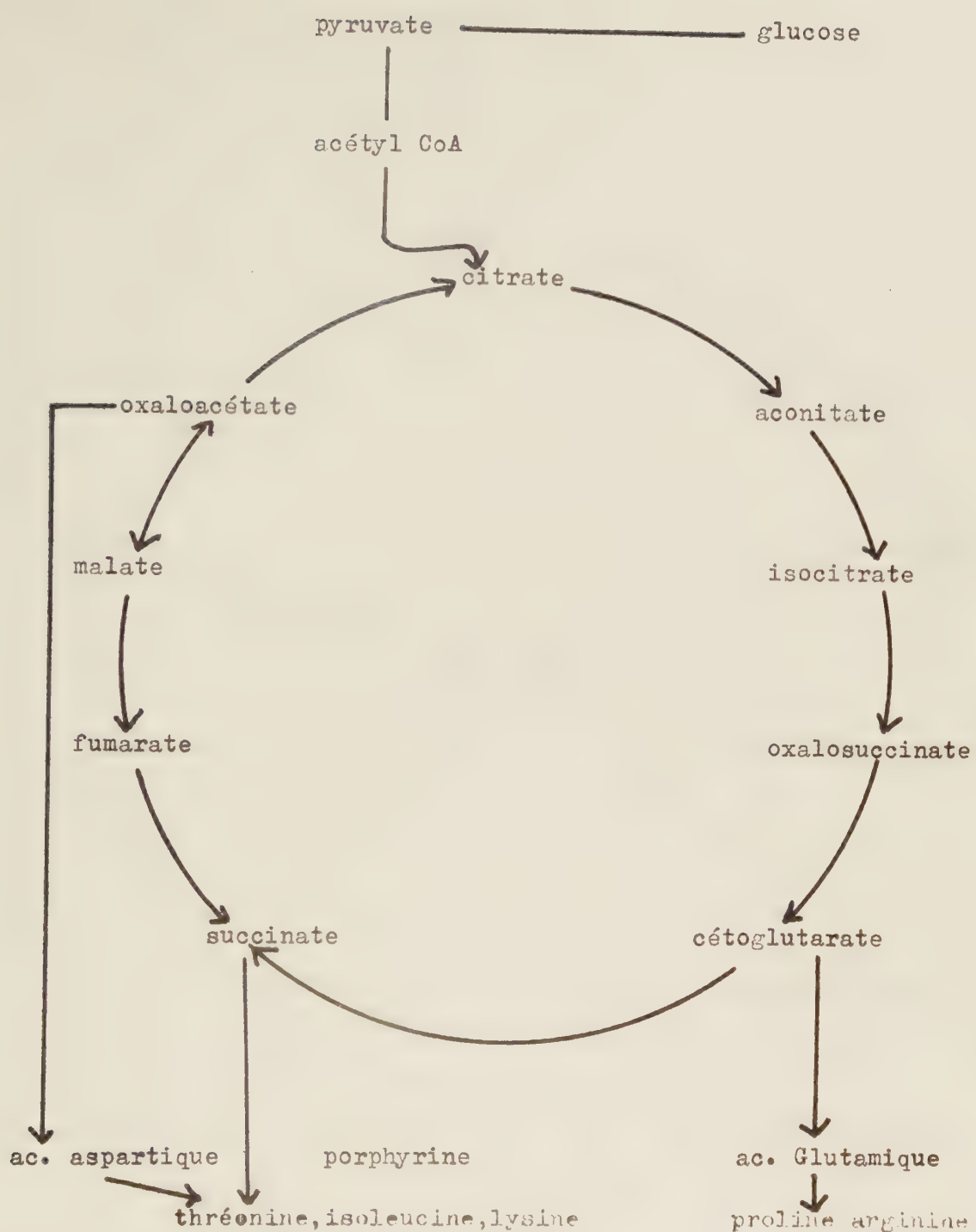


Figure n°4 Rôle biosynthétique du cycle de Krebs en croissance
sur glucose

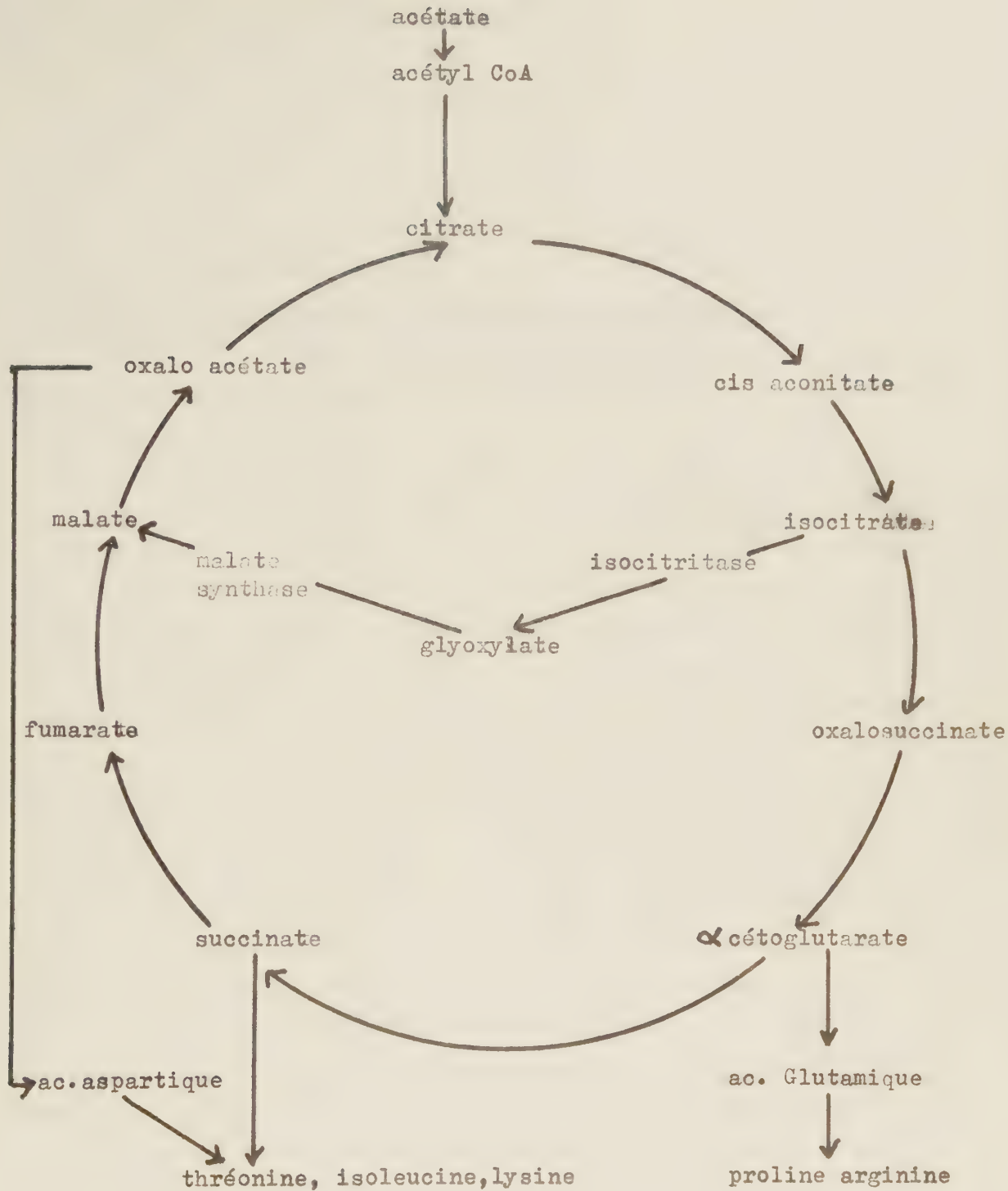


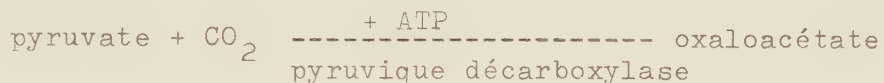
Figure n°5 Rôle biosynthétique et énergétique du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique en croissance sur acétate.

Au cours de notre travail, nous envisagerons deux cas de répression catabolique :

- 1°/ répression catabolique des enzymes respiratoires chez *S. cerevisiae* et *carlbergensis* ou Contr'Effet Pasteur
- 2°/ répression catabolique de l'alphaglucosidase et de la perméase du maltose.

Depuis les travaux de Vanderwinkel (1958-1960) et de Wiame (1957), nous savons que le cycle de Krebs constitue la voie d'oxydation chez la levure. La participation du cycle de Krebs comme voie d'oxydation avait d'abord été contestée par Krebs lui-même (1952) à cause de la non oxydation de certains membres du CTC, due à des difficultés de pénétration dans les cellules entières de ces composés. Linnane (1955) et Vanderwinkel (1960) ont obtenu l'oxydation de tous les membres du cycle de Krebs ainsi que de l'acétate par des granulations cytoplasmiques analogues aux mitochondries trouvées chez les animaux. Le cycle de Krebs a à la fois un rôle énergétique comme mécanisme producteur d'ATP et un rôle biosynthétique en fournissant les composés précurseurs des acides aminés : l'alpha cétooglutarate pour l'acide glutamique, proline et arginine, l'oxaloacétate et le succinate pour l'acide aspartique, la thréonine, l'isoleucine et la lysine. En anaérobiose ou en croissance sur glucose, le cycle de Krebs est présent (Aubert 1956- Wiame 1957) mais est incomplet par manque d'activité de la succinique déshydrogénase et des enzymes du shunt glyoxylique (Vanderwinkel 1960). figure n°4- Dans ce cas, le CTC ne joue plus qu'un rôle biosynthétique. Vanderwinkel (1960) a montré un fonctionnement partiel du cycle de Krebs en anaérobiose ou en croissance sur glucose en mesurant la décarboxylase de l'acide pyruvique et l'acéto CoAkinase, Ces enzymes sont présentes quelles que soient les conditions de culture. En croissance sur acétate ou éthanol, le cycle est à nouveau complet (figure n°5). Sur ces

substrats en C₂, les enzymes du shunt glyoxylique : isocitritase et malate synthase sont synthétisées et servent à reformer les composés en C₄ : succinate et malate, à partir de composés en C₂ sans passer par le stade alphacétoglutarate et le fumarate. Ces enzymes évitent ainsi une rupture du cycle au niveau de l'alpha cétoglutarate, fumarate et oxaloacétate dont l'utilisation permet de couvrir les besoins biosynthétiques de la cellule (Kornberg 1957). Une autre voie de recharge du cycle part du pyruvate (Ruiz Amil et al 1965) :



Nous avons vu que le Contr'Effet Pasteur se traduit par une utilisation du glucose par fermentation en culture aérobie lorsque la concentration en sucre dépasse $6 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Lorsque le glucose est consommé, la levure oxyde l'éthanol accumulé. L'adaptation à l'oxydation de l'éthanol se fera plus ou moins rapidement suivant la souche de levure envisagée. Cette adaptation est notamment très différente pour les deux ~~types~~ ^{types} de levure utilisées par l'industrie brassicole c'est-à-dire *S.cerevisiae* ou levure haute et *S. carlsbergensis* ou levure basse. La caractérisation biochimique de ces deux types de levure se base sur la fermentation du raffinose : la levure haute fermente 1/3 du raffinose et est incapable de fermenter le mélibiose. La levure basse utilise le mélibiose après adaptation et fermente donc complètement le raffinose (Lindegren 1949- Kreger Van Rij 1967). Les travaux d'Haboucha et al (1960) montrent que l'adaptation à la respiration est très différente pour ces deux types de levure. Si le début de la croissance sur glucose se caractérise par une utilisation du sucre exclusivement par fermentation, l'adantation à la respiration de l'éthanol formé est beaucoup plus rapide et sa vitesse de croissance sur ce substrat plus élevée chez

S.cerevisiae que chez *S.carlbergensis*. L'étude de l'utilisation de l'éthanol et de l'acétate par des cellules non proliférantes donne des valeurs égales pour les deux levures à condition d'adapter *S.carlbergensis* préalablement à la respiration. Pour *S.cerevisiae*, nous obtiendrons une seule phase de croissance exponentielle, tandis que pour *S.carlbergensis* la croissance se fera en deux parties avec un arrêt de croissance appelé diauxie (Monod 1942). L'épuisement du milieu en sucres a pour conséquence un ralentissement, puis un arrêt de la croissance. L'éthanol accumulé n'est ensuite utilisé qu'après une période d'adaptation. Cette réorganisation implique des modifications importantes au niveau des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques et du shunt glyoxylique.

L'évolution de l'activité des enzymes respiratoires au cours de la croissance aérobie montre que le glucose inhibe partiellement la synthèse de la succinique déshydrogénase, de l'isocitrique déshydrogénase, de l'acétyl CoAkinase et complètement la synthèse de la malate synthase, de l'isocitrique lyase ainsi que des enzymes effectuant le transport d'électrons (Strittmatter 1957- Mac Quillan et Halvorson 1962- Polakis 1965- Yayaraman 1966 - Suomolainen 1968- Beck et Von Meyerburg 1968). La synthèse de ces mêmes enzymes reprend après épuisement complet du glucose. Ces résultats ne pourraient cependant pas s'expliquer par une simple répression. En effet une partie de l'activité des enzymes préformées est également inhibée (Polakis 1965- Chapman 1968).

Halvorson (1962), Tustanoff et Bartley (1962-1964) , Utter (1967) et Görts (1967) signalent par ailleurs que le galactose ainsi que le maltose sont des répresseurs des enzymes respiratoires moins efficaces que le glucose. En effet,

en croissance même anaérobie sur galactose, une certaine respiration subsiste ainsi qu'une activité des enzymes respiratoires : la cytochrome c oxydase. L'oxygène resterait cependant l'inducteur des enzymes respiratoires. En effet, Somlo (1965) attribue l'activité résiduaire des enzymes respiratoires en croissance anaérobie sur galactose à des traces d'oxygène présentes dans l'azote utilisé pour assurer l'anaérobiose.

Parallèlement à la diminution de la capacité respiratoire, on constate également des modifications importantes au niveau des mitochondries, celles-ci ne sont plus visibles au microscope électronique (Polakis et al 1964- Yayaraman 1966). Les cellules cultivées en anaérobiose et en présence de glucose présentent cependant des structures membraneuse qui seraient les précurseurs des mitochondries (Yotsuyanagi 1962- Linnane et Vitols 1962).

Cette régulation des enzymes de la respiration et cette disparition des mitochondries dépendent de la concentration en glucose utilisée. En général en dessous de $6 \cdot 10^{-3} M$ (0,06%), une dérépression des enzymes sensibles à l'effet du glucose est observée (Strittmatter 1957- De Deken 1966- Van Wijk 1972).

Un autre exemple de répression catabolique sera étudié dans ce travail : il s'agit de l'effet répresseur du glucose à des concentrations supérieures à 0,2% sur la synthèse des enzymes de la maltozymase: la perméase du maltose et l'alpha-glucosidase (Halvorson et al 1957- Sutton et Lampen 1962- Van Wijk 1968- Görts 1969 - De Kroon et Koningsberger 1970). Cette sensibilité de la maltozymase au glucose est différente suivant les souches de levure. Harris et Millin (1963) signalent que certaines souches de levures de brasserie se désadaptent très facilement alors que d'autres sont moins sensibles à l'effet du

glucose. La mesure de la répression de la maltozymase par le glucose a été proposée par Masschelein et al (1963) comme critère de caractérisation des levures de brasserie. L'enzyme limitant la fermentation du maltose est la perméase du maltose. Ce sera donc d'abord la synthèse de cette enzyme qui sera réprimée par le glucose (Halvorson et al 1957- Harris et Millin 1963- Görts 1969). Görts (1969) signale que le glucose non seulement réprime la synthèse de la perméase du maltose, mais que l'activité de l'enzyme préformée est également inhibée. Des augmentations de K_m indiquent une affinité décroissante de la perméase pour le maltose lorsque le glucose est présent. Lors de l'adaptation, le K_m revient à sa valeur normale après une heure. Le K_m de l'alpha glucosidase par contre reste constant. Görts explique l'inactivation de la perméase par un changement de la forme de l'enzyme ou par une transformation en sous-unités inactives.

L'effet répresseur du glucose disparaît pour des concentrations inférieures à 0,2%. On constate dans ce cas une dérépression de la maltozymase qui atteint un maximum pour une concentration en glucose de 0,15% (Van Wijk 1968). Le glucose ou un intermédiaire de son métabolisme serait soit l'inducteur soit agirait comme donneur d'énergie pour les synthèses enzymatiques (Suomolaïne 1956- Hauge et al 1961 - Mac Quillan et Halvorson 1962). La synthèse de la maltozymase dans ce cas est cependant moins importante qu'en présence de maltose (Van Wijk 1968).

Guidés par le fait que le 3-5 AMP cyclique agirait comme un inducteur pléiotrope qui dérèpriment simultanément tous les systèmes soumis à la répression catabolique, Van Wijk (1968) et Görts (1967) ont établi une corrélation entre la répression et la dérèpression des enzymes respiratoires d'une part et de celles des enzymes intervenant dans l'utilisation du maltose d'autre part. La diminution de l'activité de l'alpha-

glucosidase, de l'isocitrique déshydrogénase, de la succinique déshydrogénase est en effet parallèle en présence de glucose. De même lors de la dérégulation par le glucose 0,1% ou le galactose, l'activité croît parallèlement pour ces mêmes enzymes. Halvorson (1962) indique également une corrélation entre dérégulation de l'activité de la bêtaglucosidase, de la succinique déshydrogénase et de l'isocitrique déshydrogénase par le glucose.

Dans ce présent travail, nous allons étudier la dérégulation et l'inhibition catabolique des enzymes respiratoires et de la maltozymase. La plupart des travaux consacrés à l'étude de ces phénomènes de régulation ont été réalisés avec un nombre extrêmement restreint de souches de levures. Nous avons vu que les levures de brasserie tant de fermentation haute que basse présentent des sensibilités très différentes en ce qui concerne la régulation métabolique de la maltozymase et des enzymes respiratoires par le glucose. C'est la raison pour laquelle, il était important de vérifier dans quelle mesure les observations effectuées à ce propos pouvaient être généralisées en utilisant des levures industrielles comme matériel expérimental. Pour l'interprétation génétique des mécanismes biochimiques impliqués dans la dérégulation et l'inhibition catabolique, la connaissance de la ploïdie des souches de levures utilisées à cet effet apparaît comme une condition indispensable. De plus, seules des levures haploïdes, diploïdes ou tétraploïdes pourront servir pour une étude génétique (Hilger 1969). Or depuis les travaux d'Emeis (1965), nous savons que les levures industrielles sont polyploïdes. Emeis (1965) à l'aide d'une technique d'isolement en masse des ascospores viables a étudié une série de levures industrielles caractérisées comme *S.cerevisiae*. A l'aide d'une étude statistique du signe des ascospores, ainsi

que du nombre de resporulant, il a pu montrer que la presque totalité de ces levures étaient polyploïdes : tri, tétra et pentaploïdes. De plus, les difficultés de sporulation et l'absence de signe des ascospores ne permettent même pas de déterminer le degré de ploïdie de *S.carlbergensis*. Des observations microscopiques de ces levures font penser que celles-ci sont également polyploïdes et de ploïdie impaire ($3n$ ou $5n$). Même avec les levures industrielles *S.cerevisiae*, aucune levure haploïde n'a pu être isolée (Johnson 1963- Emeis 1965). Les difficultés rencontrées sont multiples :

1°/ beaucoup de levures industrielles y compris les levures de brasserie ont perdu la faculté de se reproduire sexuellement, à cause d'une conservation prolongée sur des milieux artificiels (Fowell 1969). Cette perte de la sporulation se retrouve surtout chez la levure de brasserie basse : *S.carlbergensis*.

2°/ les levures de ploïdies impaires $3n$ ou $5n$ donnent des ascospores aneuploïdes. Ces ascospores sont non viables.

3°/ de nombreux ascospores viables ont perdu la faculté de conjuguer avec des levures haploïdes de signe contraire.

Nous avons cependant tenté de déploïdiser les levures de brasserie, du moins celles présentant un taux de sporulation suffisant. Nous pourrions ainsi isoler des levures haploïdes à partir desquelles des mutants présentant des réponses modifiées vis à vis de la répression catabolique pourraient être obtenus. Si quelques mutants portant une délétion au niveau du promoteur et insensibles à la répression cataboliques ont été isolés chez *E.coli* par Beckwith (Ullmann 1970), il n'en est pas de même chez la levure. Un cas a cependant été décrit chez *schizosaccharomycès pombe* par Foury et Goffeau (1972). Ces chercheurs sont parvenus à isoler des mutants présentant une réponse modifiée vis à vis de la répression catabolique. L'étude de ces mutations

permettrait de mieux comprendre les mécanismes de la répression catabolique.

La plupart des connaissances actuelles concernant la génétique de la levure ont été obtenues par l'étude de la levure S.cerevisiae diploïde. Envisageons maintenant quelques notions qui permettront de mieux saisir les difficultés rencontrées avec les levures industrielles.

La levure possède un noyau entouré d'une double membrane nucléaire. Jusqu'à présent, les chromosomes n'ont pu être observés au microscope et l'information concernant ceux-ci a été obtenue surtout par des études génétiques. Hawthorne et Mortimer (1960-1965) à l'aide de gènes marqueurs de centromères ont pu identifier 16 chromosomes chez la levure haploïde S.cerevisiae. Les autres saccharomycètes n'ont pas nécessairement le même nombre de chromosomes. Environ 100 gènes ont pu être localisés sur ces chromosomes. Le cycle de vie est une succession de phases diploïdes ($2n$ chromosomes) et haploïdes (n chromosomes ou 16 chez S.cerevisiae). Sept cycles de vie différents allant des levures toujours haploïdes aux levures toujours diploïdes ont pu être identifiés chez les levures (Raper 1954). Chez S.cerevisiae, la levure se trouve normalement sous la forme diploïde, elle se reproduit par bourgeonnement. Dans certaines conditions, le noyau subit la division réductionnelle, il se forme un asque avec 4 ascospores à n chromosomes. Ceux-ci après germination donnent soit des levures haploïdes, soit fusionnent deux à deux pour reformer un zygote puis une levure diploïde. Winge et Lautsen 1937, Lindegren et Lindegren (1943) ont été les premiers à montrer qu'ils existaient des levures homothalliques et hétérothalliques. Chez ces dernières, les ascospores sont de deux types différents : a et α . Le signe est contrôlé par un ou plusieurs gènes se trouvant sur

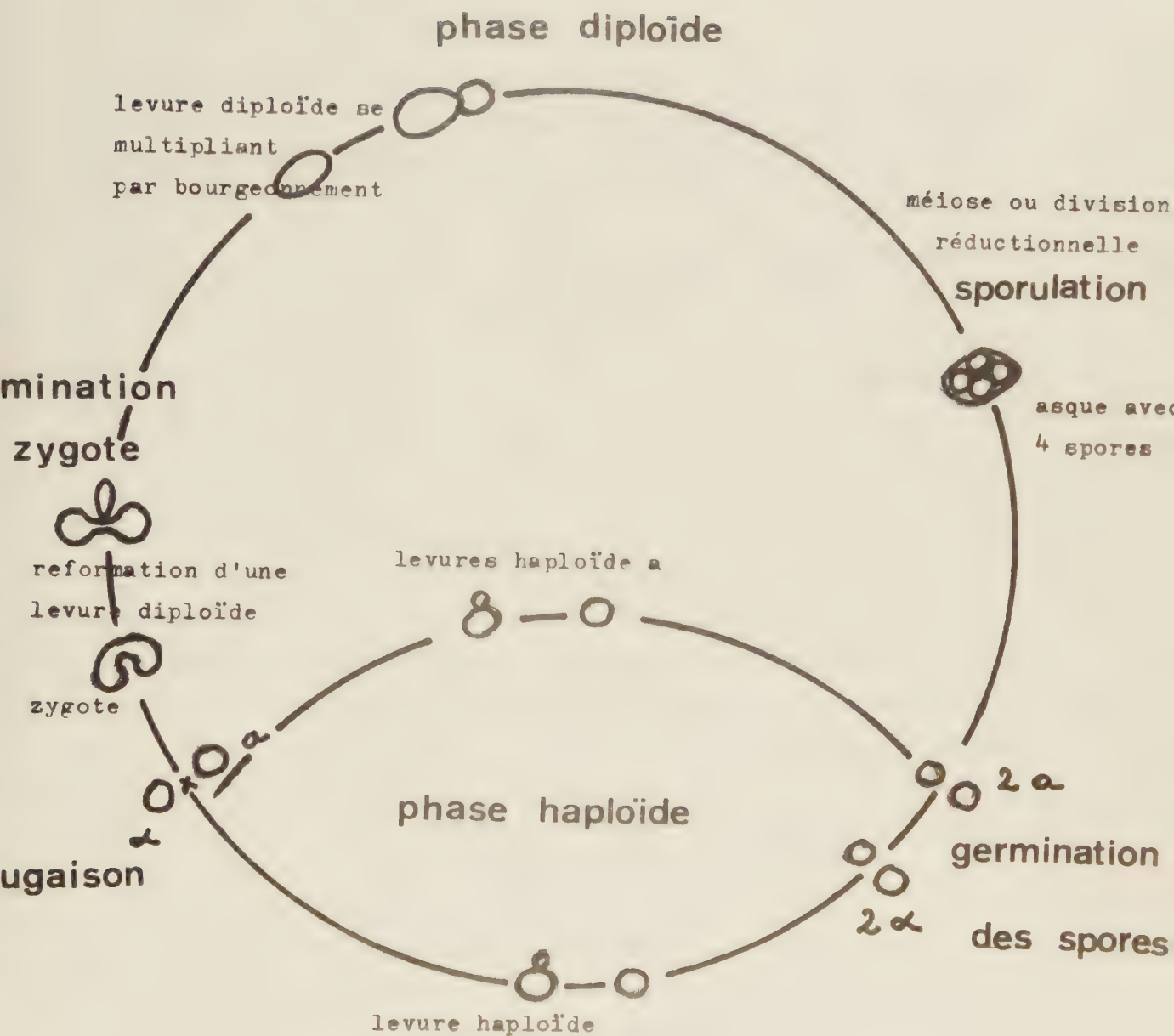


Figure 6 : Cycle de vie d'une levure *S.cerevisiae*

des chromosomes allèles : les chromosomes trois. Seuls deux ascospores de signe différent peuvent conjuguer et former un zygote, puis une levure diploïde. L'haplophase chez *S.cerevisiae* est donc réduite aux ascospores. (figure n°6) Chez les levures homothalliques, les ascospores n'ont pas de signe et conjuguent entr'eux deux à deux. Ces levures suivant Winge et Roberts (1949) possèdent un gène D de " self diploïdisation " qui est un gène dominant. Ce gène D provoque la mutation du gène responsable du signe en son allèle au cours des premières divisions lors de la germination des ascospores (Hawthorne, 1963). L'alternance d'haplophase et de diplophase confère un avantage à la levure pour sa survie dans un habitat naturel (Barnett 1959) : l'haplophase permet l'expression d'une mutation qu'elle soit récessive ou dominante et la sélection de mutants, donc l'adaptation à des changements de l'environnement. La diplophase permet de stabiliser le phénotype, les gènes récessifs étant masqués. Ce mode de reproduction permet la variation des propriétés par l'accouplement de deux cellules haploïdes d'origine différente.

Les changements suivants se passent au sein de la cellule de levure lors de la sporulation (Fowell 1969) :

- 1/ augmentation du volume de la cellule
- 2/ augmentation du mouvement du cytoplasme
- 3/ la vacuole se fragmente en petites vacuoles
- 4/ l'intérieur de la cellule devient granuleux
- 5/ les granules se condensent en une masse compacte
- 6/ le noyau se divise en deux au cours de la méiose 1, puis encore en deux au cours de la méiose 2. Il se forme 4 ascospores.
- 7/ les spores sont entourées d'un double mur cellulaire. Elles augmentent de volume au dépend du matériel se trouvant dans l'asque.

Lors de la germination, la paroi extérieure de

la spore se brise et le contenu intracellulaire en émerge entouré de la paroi intérieure. Les conditions optimales pour l'obtention d'une bonne sporulation sont les suivantes (Fowell 1955- 1960- 1969) :

- croissance sur un milieu de présporulation riche et en aération limitée.
- milieu de sporulation pauvre et bien aéré. La respiration et l'aération limitée sont deux conditions indispensables à l'obtention d'une bonne sporulation (Miller- Halpern 1956).
- la présence d'acétate et d'ions potassium favorise la sporulation (Fowell 1967).

La paroi de la spore est beaucoup plus riche en lipides que la paroi de la cellule végétative. Cette propriété est utilisée par Emeis (1958) pour isoler en masse les ascospores. Les spores sont résistantes à l'enzyme d'escargot (hélix pomatia) utilisée pour solubiliser la paroi de l'asque. La viabilité des ascospores est sous contrôle génétique. Une mauvaise viabilité peut être due : à l'aneuploïdie (nombre de chromosomes incomplets), à une ploïdie impaire ($3n$ ou $5n$), à des mutations léthales (Mortimer et Hawthorne 1966).

Avant de conjuguerⁿ, les cellules haploïdes de signe contraire s'agglutinent, les chances de rencontre entre deux levures de signe contraire sont ainsi augmentées. Cette agglutination est due à un facteur diffusible, thermolabile, pouvant être isolé (Brock 1958- Taylor 1964). Ce facteur est une mannane protéine (Taylor 1965), dont la protéine est riche en ponts disulfures (Taylor et al 1968), indispensables à l'activité du facteur. L'agglutination préalable à la conjugaison ne se rencontre pas chez tous les saccharomycètes. Certaines souches de levures sont non agglutinantes. La mauvaise conjugaison de beaucoup de levures haploïdes peut être provoquée par une non agglu-

mination. Chez la levure hétérothallique, les cellules haploïdes de signe a ou α sont capables de conjuguer avec les cellules de signe contraire. Cependant le type a d'une levure A peut par exemple très facilement conjuguer avec les levures de signe α d'une levure B alors qu'il ne conjugue pas avec les α d'une levure C. Cette absence de conjugaison pourrait s'expliquer par des compositions différentes en protéines des murs cellulaires des levures haploïdes.

Lors de la conjugaison, après agglutination, il y a formation d'un tube ou canal entre les deux levures. La fusion des deux noyaux a lieu dans ce tube. Une enzyme semblable à celle agissant lors du bourgeonnement, lyse la paroi des deux cellules haploïdes pour que les matériels cellulaires puissent entrer en contact l'un avec l'autre (Brock 1961). La culture dans des conditions artificielles comme celles utilisées dans un laboratoire provoque la perte de la faculté de conjuguer avec le signe opposé chez beaucoup de levures haploïdes. Cette absence de conjugaison pourrait être due à une mutation des gènes impliqués dans le contrôle de la conjugaison.

2- OBJET DU TRAVAIL.

Le travail se composera de trois parties :

- 1°/ Dans une première partie, nous envisagerons le problème de la régulation du métabolisme oxydatif chez *S.carlsbergensis*. Chez cette levure, le Contr'Effet Pasteur est particulièrement marqué. Ceci nous a amené à préciser les conditions qui déterminent la répression d'une des enzymes du cycle de Krebs : la succinique déshydrogénase et des enzymes du shunt glyoxylique : l'isocitritase et la malate synthase.
- 2°/ Dans une deuxième partie, nous étudierons la répression par le glucose de la perméase du maltose et de l' alphaglucosidase. Nous envisagerons la régulation de la maltozymase chez différents *S.cerevisiae* et *carlsbergensis*. L'éventuelle corrélation qui existerait entre la répression des enzymes respiratoires et celle de la maltozymase sera examinée pour chacune des souches analysées.
- 3°/ Dans la troisième partie, nous envisagerons la possibilité d'isoler des souches haploïdes à partir de quelques levures industrielles. Comme nous l'avons vu cette étude constitue une étape indispensable en vue de l'analyse du ou des mécanismes de régulation qui caractérisent le comportement physiologique des levures de brasserie. L'isolement de ségrégeants haploïdes ouvre par ailleurs de nombreuses autres possibilités notamment l'amélioration des souches par hybridation et le contrôle de la production des alcools supérieurs, esters, cétones et des produits soufrés par la sélection de mutants appropriés.

3- TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

3.1- SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE.

3.1.1- Souches de levures.

Les levures utilisées dans ce travail, sont des levures industrielles provenant de l'industrie brassicole et appartenant à notre collection. Ce sont les levures hautes ou *S.cerevisiae* n° 101- 106- 123 et 173, les levures basses ou *S.carlsbergensis* 167- 337- 338- 339- 340 et 350, une souche de *S.diastaticus* S.D.

D'autres levures taxonomiquement définies comme *S.cerevisiae* et *carlsbergensis*, mais provenant d'une origine différente de la brasserie ont été employées. Ce sont les levures *S.cerevisiae* suivantes : une levure " yeast foam " diploïde, ainsi que deux levures haploïdes : une de signe a et l'autre de signe σ , les levures *S.carlsbergensis* : n° 306 et 311. Ces levures ont aimablement été mises à notre disposition par Mme Grenson de l'Institut de Recherches du CERIA pour les levures " yeast foam" et par le Professeur Windisch de la Technische Hochschule de Berlin pour les levures 306 et 311.

3.1.2- Milieux de culture.

Milieu n°1 préparé d'après la composition du milieu 149 de l'Institut de Recherches du CERIA :

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,7g		
$CaCl_2$	0,4g		
NaCl	0,5g		
$(NH_4)_2SO_4$	1,2g		
ac.citrique	10,5g		
trace minérale	1 ml	H_2O distillée	un litre

Amener le milieu à pH 6,1 à l'aide de KOH avant stérilisation. Stériliser à un Kg pendant 20 minutes. A ce milieu, ajouter après stérilisation une solution stérile de glucose contenant 20g ou 1,5g ou une solution de maltose contenant 20g ou 1,5g ainsi que dix ml de la solution stérile de vitamines.

Solution de traces minérales par litre

acide borique	10mg
sulfate Cu $5H_2O$	1mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	5g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	400mg
Molybdate Na	4mg
sulfate Zn $7H_2O$	14mg
acide citrique	10g

Solution de vitamines par litre

panthoténate de Ca	200mg
biotine	250microg
acide nicotinique	100mg
thiamine	100mg
inositol	50mg
riboflavine	100mg
ac. para aminobenzoïque	50mg
pyridoxine	100mg

Stériliser 10 minutes à 1/2kg de pression.

Milieu n°2.

glucose ou maltose	20g	
SO_4Mg	0,5g	
$CaCl_2$	0,5g	
$SO_4(NH_4)_2$	2,6g	
yeast extract Difco	5g	
KH_2PO_4	1,87g	
K_2HPO_4	1,1g	
H_2O distillée	un litre	pH 6,5

Stériliser à un Kg pendant 20 minutes.

Stériliser à part le glucose, SO_4Mg et CaCl_2 .

Milieu n°3 même milieu que le n°2, mais additionné de 20g de gélose.

3.1.3- Techniques de culture

Croissance en culture non agitée: la croissance se fait à 30°C dans des fioles cylindro coniques remplies au 3/4 de leur capacité.

Croissance aérobie : les croissances se font à 30°C, l'aération est réalisée par agitation sur un plateau muni d'un mouvement de translation circulaire.

Mesure de la croissance : les fioles de croissance sont munies d'un tube optique qui permet de suivre régulièrement l'opacité de la culture sans prise d'échantillon. Les opacités sont exprimées en densité optique : $\text{D.O} = \log I^0/I$ pour une épaisseur de un cm. Un étalonnage préalable permet de ramener la densité optique au mg de levure sèche / ml.

3.2- DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

3.2.1- Méthodes de préparation de l'extrait .

Les extraits enzymatiques sont réalisés de différentes manières :

3.2.1.1- perméabilisation par un cycle de plusieurs congélations à - 60°C dans un mélange acétone carboglace et de décongélations dans un bain thermostatique à 30° (Halvorson et Ellias 1958).

La levure est mise en suspension dans un tampon phosphate 0,067M pH 6,8 avant congélation.

3.2.1.2- extrait à l'aide d'ultra-sons : la levure est mise en suspension dans le tampon phosphate 0,067M pH 6,8 à raison de 5g de levure centrifugée dans 12ml de tampon, la levure est préalablement congelée à -18°C. Appareil ; Raythéon Sonic Oscillator DF101 à refroidissement par circulation d'eau + glycol à 0°C.

Malgré un rendement d'extraction excellent (30 à 40mg de protéines

par ml déterminées par la méthode au biuret), cette technique présente l'inconvénient de nécessiter des quantités importantes de levures.

3.2.1.3- extrait par broyage : la levure est congelée à -18°C , puis broyée dans un mortier avec une quantité égale de corindon. Après un broyage de dix minutes, l'extrait est repris dans le tampon approprié et centrifugé à froid dix minutes à 9.000g (15.000 tours / minute). Le surnageant opalescent sert pour les déterminations enzymatiques.

3.2.1.4- perméabilisation à la nystatine (Béchet 1965) : la levure lavée est mise en suspension dans le tampon à une concentration équivalente à un mg de levure sèche / ml, puis additionnée de 65 /ml de nystatine. Après 30 minutes d'action à 30°C , la suspension est refroidie à 0° et conservée à cette température jusqu'à la détermination de l'activité.

3.2.1.5- extrait par éclatement des protoplastes (Suomolaïnen 1965)
Les levures lavées sont mises en suspension à raison de 100mg de levure sèche / ml dans un mélange mannitol $0,8\text{M}$, tampon TRIS pH $7,5$ $0,01\text{M}$, mercaptoéthanol $0,01\text{M}$. Après 15 minutes d'action, le mercaptoéthanol est éliminé par centrifugation. Le mur cellulaire de la levure est attaqué par 5% de jus d'escargot helix pomatia (Industrie Biologique Française Gennevilliers). Après 40 minutes d'action, l'enzyme d'escargot est éliminé par centrifugation, les protoplastes sont repris dans de l'eau bidistillée. Après éclatement des protoplastes, la suspension est centrifugée et une partie aliquote de la solution surnageante est prélevée pour la détermination de l'alphaglucosidase. On dose ainsi l'enzyme libre. Pour doser l'enzyme liée, Suomolaïnen propose de reprendre le culot de la dernière centrifugation par deux ml de désoxycholate de sodium à $0,05\%$, la suspension est agitée cinq minutes à 0°C , centrifugée et l'activité de l'alphaglucosidase est mesurée dans

le surnageant.

3.2.1.6- détermination des protéines dans l'extrait (Robinson-Hodgen 1940- Mehl 1944- Lowry 1951)

Réactif : Dissoudre 8g NaOH dans 300ml d'eau bidistillée. Après dissolution, ajouter 9g de tartrate de K et Na. Dissoudre 3g de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 500ml d'eau bidistillée, mélanger les deux solutions. Ajouter pour terminer 5g de KI, compléter à un litre et conserver le réactif à l'abri de la lumière.

Dosage : 1 ml d'échantillon + 0,15ml TCA 3M. Centrifuger. Egoutter le précipité et dissoudre le culot de protéines dans 2,5ml de réactif de biuret. Le blanc est constitué par 2,5ml d'eau bidistillée + 2,5ml de réactif de biuret. Après dissolution du précipité, compléter à 5ml avec de l'eau bidistillée et mesurer la densité optique 60 minutes après l'addition du réactif à 545 nanomètres. Pour une cuvette de 1 cm, la densité optique lue multipliée par 20 nous donne la quantité de protéines en mg contenue dans la prise.

3.2.2- Dosages enzymatiques

3.2.2.1- Mesure du pouvoir respiratoire: Le pouvoir respiratoire ou QO_2 est le nombre de microlitres d'oxygène absorbés/ heure / mg de levure sèche. Il est déterminé par la technique manométrique de warburg (Umbreit- Burris et Stauffer 1951). Les cellules sont récoltées par centrifugation, lavées à l'eau physiologique et mises en suspension dans un tampon phosphate M/15 pH 4,5. Pour chaque essai, une quantité de levure correspondante à 2mg de levure sèche est utilisée, la concentration en glucose, maltose ou éthanol est de 0,3%, la cupule centrale est remplie de 0,2ml de KOH 20%.

3.2.2.2- Mesure de la somme perméase de maltose + alphasglucosidase

Nous mesurons la fermentation du maltose en cellules entières. Pour se faire, le dégagement de CO_2 du à la fermentation du maltosse

est déterminé par la technique manométrique de Warburg (Umbreit-Burris - Stauffer 1951). Par essai 2mg de levure sèche et une concentration en maltose de 4% sont utilisées. Le $Q_{CO_2}^{N_2}$: nombre de microlitres de CO_2 dégagés / heure / mg de levure sèche est une mesure linéaire de l'activité des deux enzymes : la perméase du maltose et l'alpha-glucosidase. Des mesures de l'alpha-glucosidase permettent par différence d'estimer l'activité de la perméase du maltose. L'anaérobiose est assurée en faisant passer un courant d'azote pendant 20 minutes.

Les dosages de l'alpha-glucosidase, de l'isocitritase et de la malate synthase sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur " Bausch et Lomb Spectronic 505 ". Les mesures sont effectuées par rapport à des blancs contenant les mêmes produits que les dosages à l'exception du substrat. Pour la malate synthase, le blanc ne contient pas d'acétyl CoA.

3.2.2.3- Mesure de l'alpha-glucosidase (Halvorson et Elias 1958)

Principe : la mesure est basée sur la réaction suivante :

paranitrophenyl α D glucopyranoside + glutathion + alpha-glucosidase
 _____ paranitrophénol + glucose.

Le paranitrophenyl α D glucopyranoside est incolore, tandis que le paranitrophénol est jaune et présente un maximum d'absorption à 400 nanomètres.

Dosage : 2,7ml de tampon phosphate 0,067M pH 6,8

0,1ml de solution de glutathion réduit (1 mg/ ml)

0,1 ml d'extrait

Le mélange est placé à 30°C pendant 15 minutes, puis la réaction est déclenchée par l'addition de 0,1 ml de paranitrophényl α D glucopyranoside (3mg / ml). L'évolution de la densité optique à 400nanomètres est suivie pendant les trois premières minutes de la réaction. Les résultats sont exprimés en micromoles de paranitrophénol formées par heure et par mg de protéines ou de

levure sèche. L'extinction molaire du paranitrophénol est :

$$E_{1\text{ cm}}^M = 9,6 \times 10^3.$$

3.2.2.4- Mesure de l'isocitritase (Olson 1954-1957- Kornberg 1964- 1966) :

Principe :



ac. isocitrique

ac. glyoxylique

ac. succinique

La mesure est basée sur la propriété que possède la phénylhydrazine de former des complexes avec les aldéhydes et avec l'acide glyoxylique. La formation de phénylhydrazone est suivie par l'augmentation de la densité optique à 324 nanomètres.

Dosage : 2 ml tampon phosphate M/10 pH 7

0,1 ml MgCl_2 M/10 (10 micromoles)

0,1 ml de phénylhydrazine (10 micromoles)

0,1 ml de cystéine (6 micromoles)

0,05ml à 0,2ml d'extrait

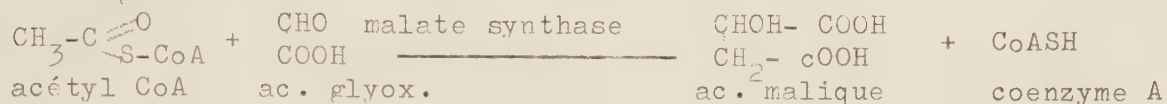
Après stabilisation de la température, la réaction est déclenchée par l'addition de 0,1 ml d'isocitrate : 10 micromoles. La réaction est suivie au spectrophotomètre enregistreur pendant 4 minutes. Les résultats sont exprimés en micromoles de glyoxylate formées par heure et par mg de protéines. L'extinction molaire est de $E_{324\text{ nanomètres}}^1\text{ cm} = 1,24 \times 10^4$.

Préparation de l'isocitrate : la solution d'isocitrate est préparée à partir de la lactone de l'acide dl isocitrique. La lactone est hydrolysée à chaud par la soude : 348mg de lactone (2mM) + 10 ml H_2O bidistillée + 1,4 ml NaOH 5N. Le mélange est placé 10 minutes au bain marie bouillant, refroidi , ajusté à pH 7 et porté à 20 ml. On obtient ainsi une solution 0,1M en acide dl isocitrique. La quantité de soude ajoutée respecte le rapport

3 moles d'NaOH par mole d'acide isocitrique.

3.2.2.5- Mesure de la malate synthase (Dixon et Kornberg 1959)

Principe :



On mesure la vitesse de rupture de la liaison thioester de l'acétyl CoA à 232 nanomètres en présence de glyoxylate. Cette rupture entraîne une chute de la densité optique due à la différence d'absorption entre le CoASH libre et son dérivé acylé. Nous mesurons donc la diminution de la densité à 232 nanomètres.

Dosage : 2,5ml de tampon TRIS HCL 0,1M pH 8

0,1 ml MgCl_2 0,1M

0,01 à 0,05 ml d'extrait

Après thermostatisation à 30°C, on ajoute 0,06ml de la solution d'acétyl CoA : 5 micromoles. Cette concentration en acétyl CoA donne une densité optique de départ de 0,800. La réaction est déclenchée par l'addition de 0,1ml d'une solution de glyoxylate $2 \cdot 10^{-2}$ M. La réaction est linéaire pendant un minute.

Préparation de l'acétyl CoA à partir du coenzyme A (Stadman 1956)

On ajoute successivement à 15mg de CoASH :

2 ml H_2O bidistillée

0,6ml KHCO_3 M

0,45 ml d'anhydride acétique 0,3M préparé fraîchement et à froid.

Après dix minutes, on mesure la disparition des groupes SH libres au papier trempé dans une solution de nitroprussiate. S'ils subsistent des SHs libres, on ajoute 0,05ml d'anhydride acétique. On porte ensuite à pH 6 avec HCL et amène à 4ml, on obtient ainsi une solution à 5 micromoles / ml. Les résultats sont exprimés en

micromoles d'acétyl CoA consommées par heure et par mg de protéine.
L'extinction molaire est de $E_{232}^{1 \text{ cm}} = 4,5 \times 10^6$.

3.2.2.6- Mesure de la succinique déshydrogénase (Singer 1957- Linnane 1963- Polakis 1965).

Principe : le métosulfate de phénazine se couple avec la déshydrogénase succinique primaire (FP), il est réduit en son leuco dérivé, celui-ci se réoxyde spontanément en produisant de l' H_2O_2 .
Phénazine + succin. désh. primaire (FPH2) ----- phénazine H2 + FP
Phénazine H2 ----- Phénazine + H_2O_2 .

On ajoute du cyanure de K à la réaction, le cyanure sert à inhiber la cytochrome oxydase, tout en ne changeant pas l'activité de la succinique déshydrogénase. Il sert en plus à protéger l'enzyme contre l'oxydation des groupes SH par H_2O_2 produite.

Dosage : on mesure la consommation d'oxygène au moyen de la technique manométrique de Warburg (Umbreit et al 1951)

Dans le compartiment central, on place

1 ml de tampon phosphate K M/10 pH 7,7

0,1 ml KCN $3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

1 ml d'extrait

Dans la corne latérale, on pipette

0,05 ml de métosulfate de phénazine (4mg)

0,1 ml de succinate pH 7,7

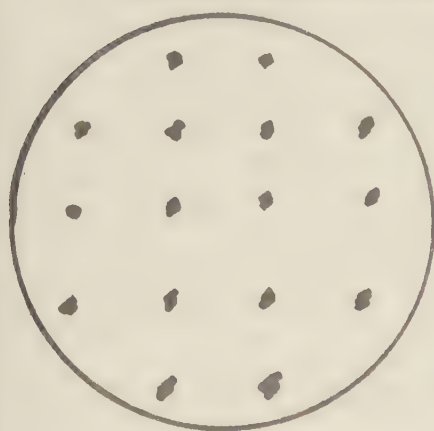
L'équilibration thermique se fait pendant cinq minutes, puis la consommation d'oxygène est mesurée toutes les deux minutes pendant 8 minutes. La réaction n'est linéaire que pendant les 6 à 7 premières minutes. Le métosulfate de phénazine a été choisi car il réagit rapidement avec la succinique déshydrogénase que celle-ci soit sous la forme soluble ou liée à des particules.

3.2.2.7- Mesure du maltose dans le milieu de croissance

La levure est séparée par centrifugation et le maltose contenu dans le milieu est déterminé par la méthode à l'anthrone (Seifter

Figure 7

Induction de la sporulation



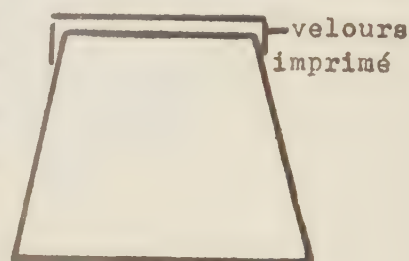
Levures diploïdes
repiquées en quadrillage
sur le milieu de
présporulation

plaque de petri avec
le milieu de présporul.



impression du velours

plaque avec le milieu
de sporul.



impression
du milieu de
sporulation.

Figure 8

Dissection des asques et isolement des ascospores à l'aide
de la micromanipulation.

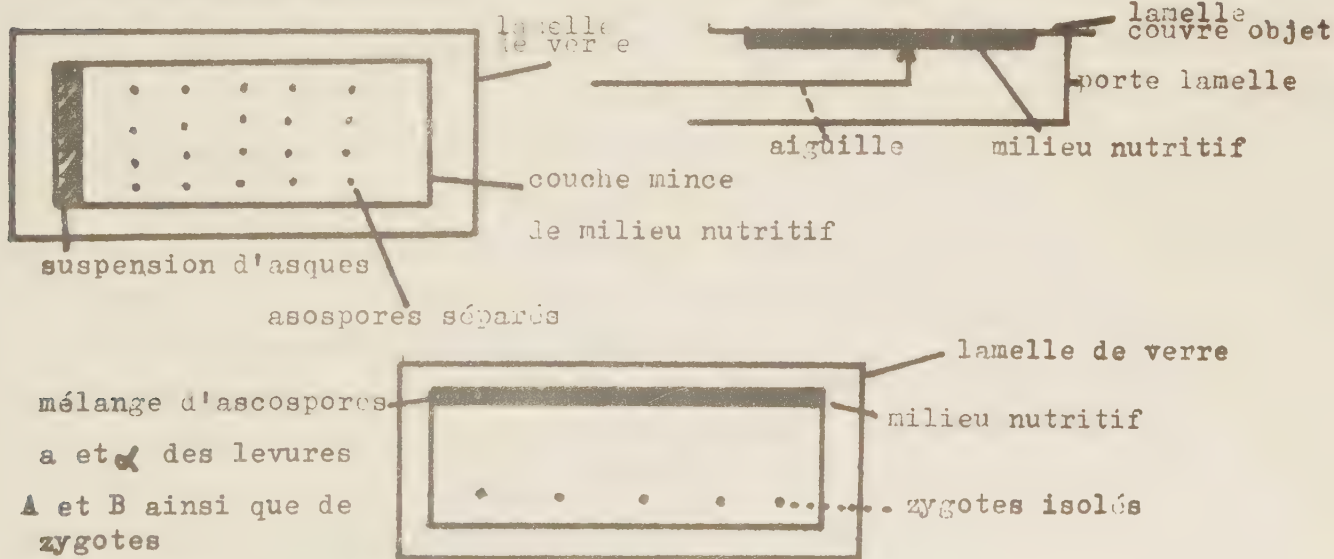
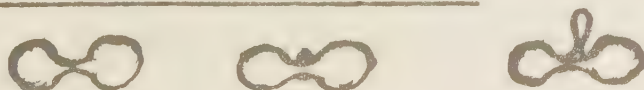


Figure n°9 Isolement des zygotes



figures de zygotes

et al 1950). Les hexoses ou les polysaccharides formés d'hexoses ici le maltose chauffés en présence d'un acide minéral se transforment en 5 hydroxy méthylfurfural, celui-ci forme un complexe coloré avec l'anthrone. On obtient une coloration verte dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre à 625nm.

3.3- METHODES GENETIQUES.

3.3.1 - Milieu de présporulation

glucose 2%

extrait de levure 0,5%

gélose 2%

3.3.2- Milieu de sporulation (Fowell 1952)

acétate de K 0,4%

gélose 1,5%

Ajuster le pH à 6,5 avec l'acide acétique dilué.

3.3.3- Test de sporulation

Les différentes colonies de la levure à examiner sont repiquées en quadrillage sur le milieu de présporulation. Après 48 heures d'incubation à 30°C, la levure est appliquée sur le milieu de sporulation à l'aide de la technique de réplique de Lederberg (Lederberg 1956) figure 7. Après 48 heures à 30°C, les figures de sporulation sont recherchées au microscope. Si les figures sont trop peu nombreuses, le temps d'incubation est augmenté.

3.3.4 - Isolement des ascospores

L'isolement des ascospores se fera par deux techniques différentes: l'isolement à l'aide de la micromanipulation et l'isolement en masse suivant la technique d'Emswiler (Emswiler 1958)

3.3.4.1 - isolement à l'aide de la micromanipulation (figure 8)

La microdissection se fait après digestion de la paroi cellulaire de l'asque par le suc digestif de l'escargot "helix pomatia" (Industrie biologique française - Gennevilliers- Seine)

Johnson et Mortimer 1959. La préparation est additionnée immédiatement avant emploi de 15mg de cystéine / ml. Le jus d'escargot est centrifugé stérilement et placé dans un tube stérile.

Il est dilué 4 fois par de l'eau distillée stérile. Une suspension dense d'asques est réalisée dans ce mélange. Elle est conservée 16 heures à 0°C. Une couche mince du milieu nutritif est fabriquée en versant 5 ml du milieu bouillant dans une boîte de pétri et en l'étalant en une couche uniforme. On découpe ensuite une plaque de milieu solidifié et on la place sur la lamelle porte-objet. Une partie de la suspension dense d'asques est étalée sur un des bords de la couche mince. La Lamelle porte-objet est placée sur le porte lamelle et le tout est glissé sous le microscope servant à la micromanipulation. A l'aide d'une micro aiguille en verre, les asques à 4 spores sont transportés, cassés et les 4 ascospores disposés en ligne à 3 mm de distance les uns des autres.

3.3.4.2- Isolement en masse des ascospores

Lorsque le taux de sporulation est satisfaisant, la plaque de pétri avec le milieu de Fowell est lavée avec 1,5ml de Tween 0,5% stérile. Les asques sont alors cassés dans un vibreur

" Braun ", cet appareil secoue très vivement un mélange d'asques et de billes de verre de 0,25mm de diamètre à 0°C. Après 15 secondes d'agitation, on sépare les ascospores des levures et des débris par centrifugation fractionnée en présence d'huile de paraffine. Les cellules végétatives, les débris d'asques se retrouvent dans le culot, les spores à cause des propriétés lipophiles de leur paroi se placent à l'interphase entre la phase aqueuse et la phase huile de paraffine. les ascospores sont repris avec un fil de platine et étalés sur le milieu complexe de présporulation.

3.3.4.3- Détermination du signe des ascospores

Une goutte de suspension de l'ascospore à examiner est mélangée

à une goutte de suspension d'une levure haploïde de signe connu.

Deux heures après le mélange, les figures caractéristiques de zygotes sont recherchées au microscope. (figure 9)

Un test positif signifie que l'ascospore possède un signe contraire à celui de la levure haploïde utilisée.

Figure 10 : Croissance de *S. cerevisiae* et *carlbergensis* sur glucose 0,15%.

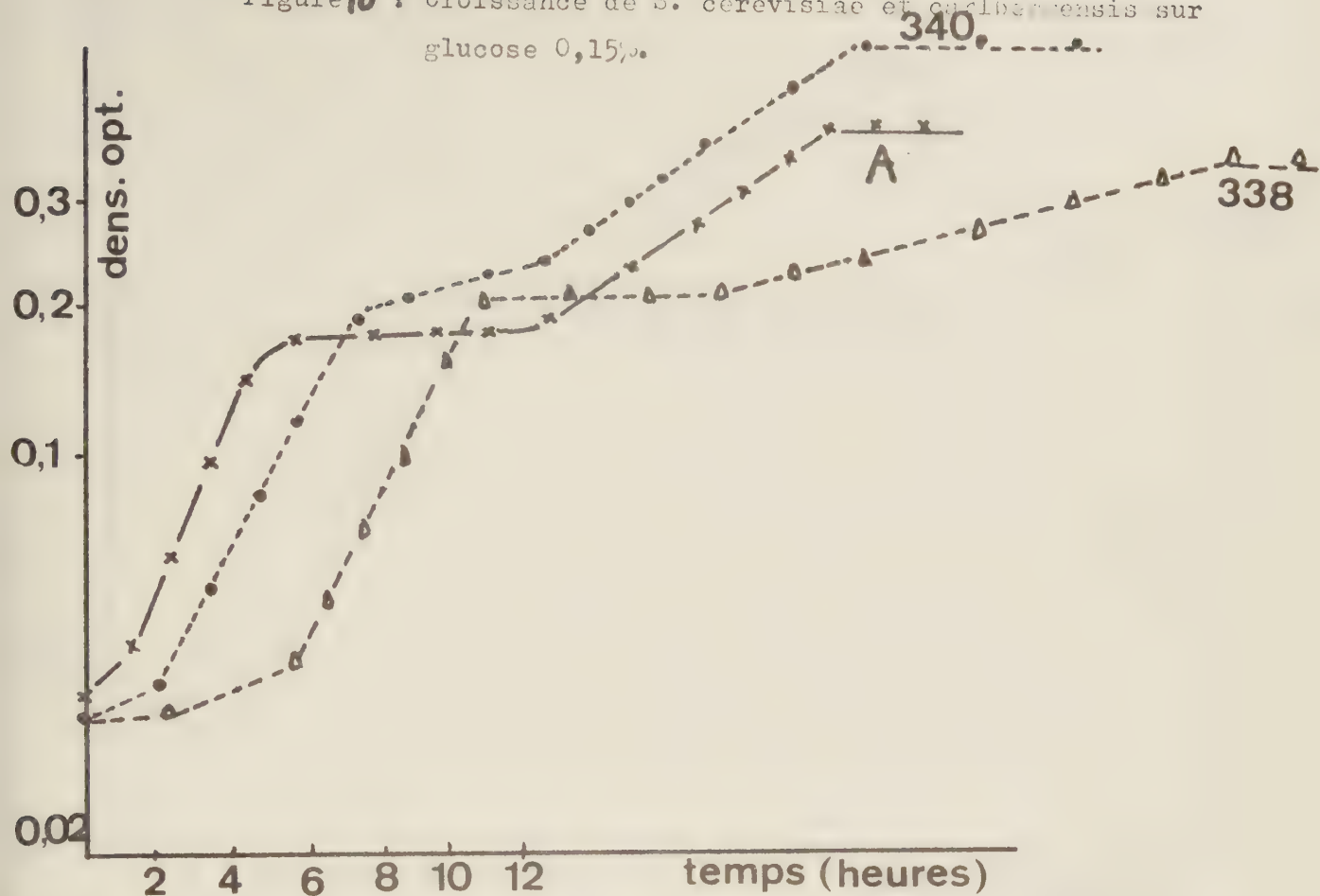


Figure n°11 : Croissance de *S. cerevisiae* et *carlbergensis* sur glucose 0,15%.

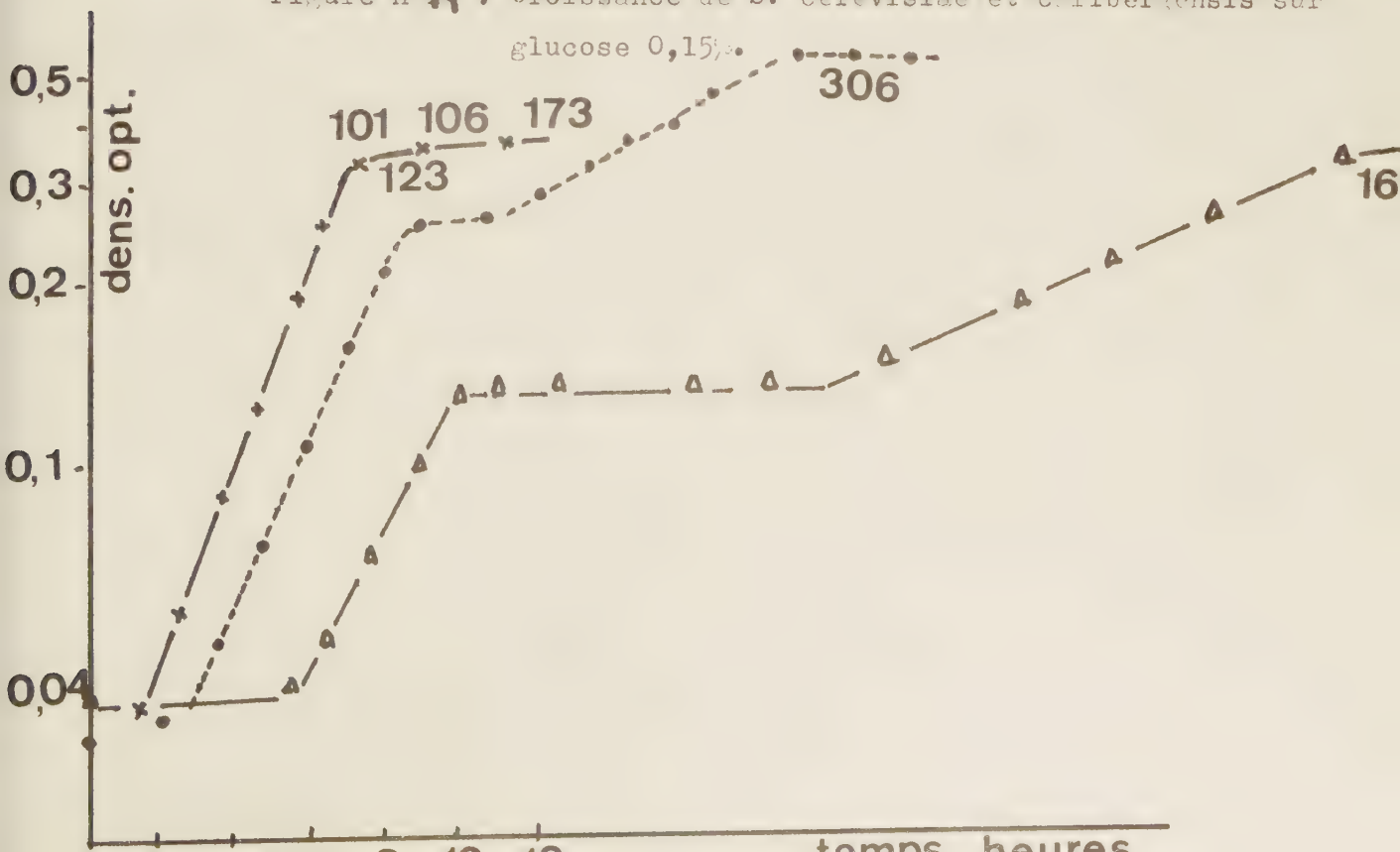


Figure n°12: Croissance de *S.cerevisiae* et *carlbergensis* sur glucose 0,15%.

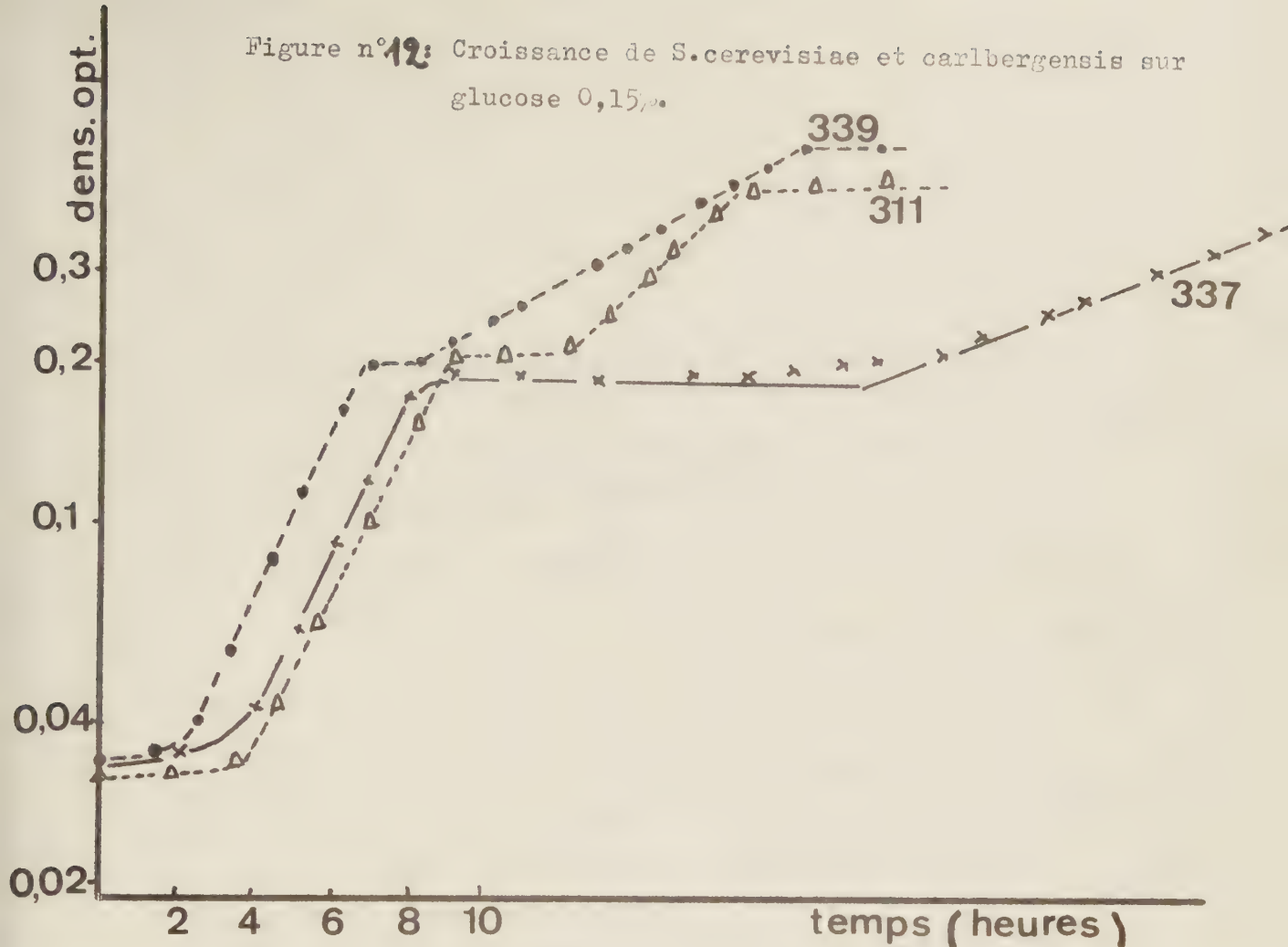


Tableau n°1 : Croissances de *S. cerevisiae* et *carlbergensis* sur glucose 0,15%

Levures	tmg 1	durée de la diauxie	tmg 2
101-106-123-173	1h3/4	-	-
306	2h	1h30	6h30
167	2h	8h	10h
340	2h	4h	6h40
A	2h	7h	6h30
338	2h30	7h	9h30
339	2h	1h30	8h
311	2h	2h	5h30
337	2h10	13h30	11h30

4- RESULTATS EXPERIMENTAUX

4.1 - CHAPITRE 1 REPRESSION CATABOLIQUE DU METABOLISME OXYDATIF CHEZ SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS.

4.1.1- Influence de la souche de levure sur l'apparition de la diauxie.

Une préculture sur moût gélosé de 48 heures est suivie d'une culture non agitée sur glucose 2% (milieu n°2). Les levures ainsi récoltées présentent un pouvoir respiratoire négligeable proche du QO_2 endogène et forment l'inoculum en vue de l'étude de la croissance. Le milieu 1 contenant 0,15% de glucose est utilisé à cet effet. L'utilisation du glucose par fermentation, puis l'oxydation de l'éthanol accumulé se traduit par une courbe de croissance présentant une diauxie. Trois paramètres variables peuvent servir de critère pour la caractérisation d'une levure de brasserie :

1°/ le temps de génération pendant la première partie de la croissance au cours de laquelle le glucose est utilisé par fermentation. Il varie de 1h3/4 à 2h30 suivant le type de levure utilisée.

2°/ la durée de la diauxie. Elle n'existe pas chez les *S.cerevisiae* étudiés ici. Certains auteurs Görts (1967) et Polakis (1964-1965) ont cependant trouvé une diauxie chez *S.cerevisiae*.

Pour les *S.carlsbergensis*, la diauxie varie d'un simple fléchissement de la courbe de croissance à un arrêt de 14 heures.

3°/ le temps de génération lorsque la levure oxyde l'éthanol. Il varie de 5 à 14 heures pour les différents *S.carlsbergensis*. Les résultats sont donnés dans les figures 10, 11, 12 et dans le tableau n°1.

Figure n° 13 : Influence du substrat hydrocarboné sur la croissance de *S. carlbergensis* (levure 167).

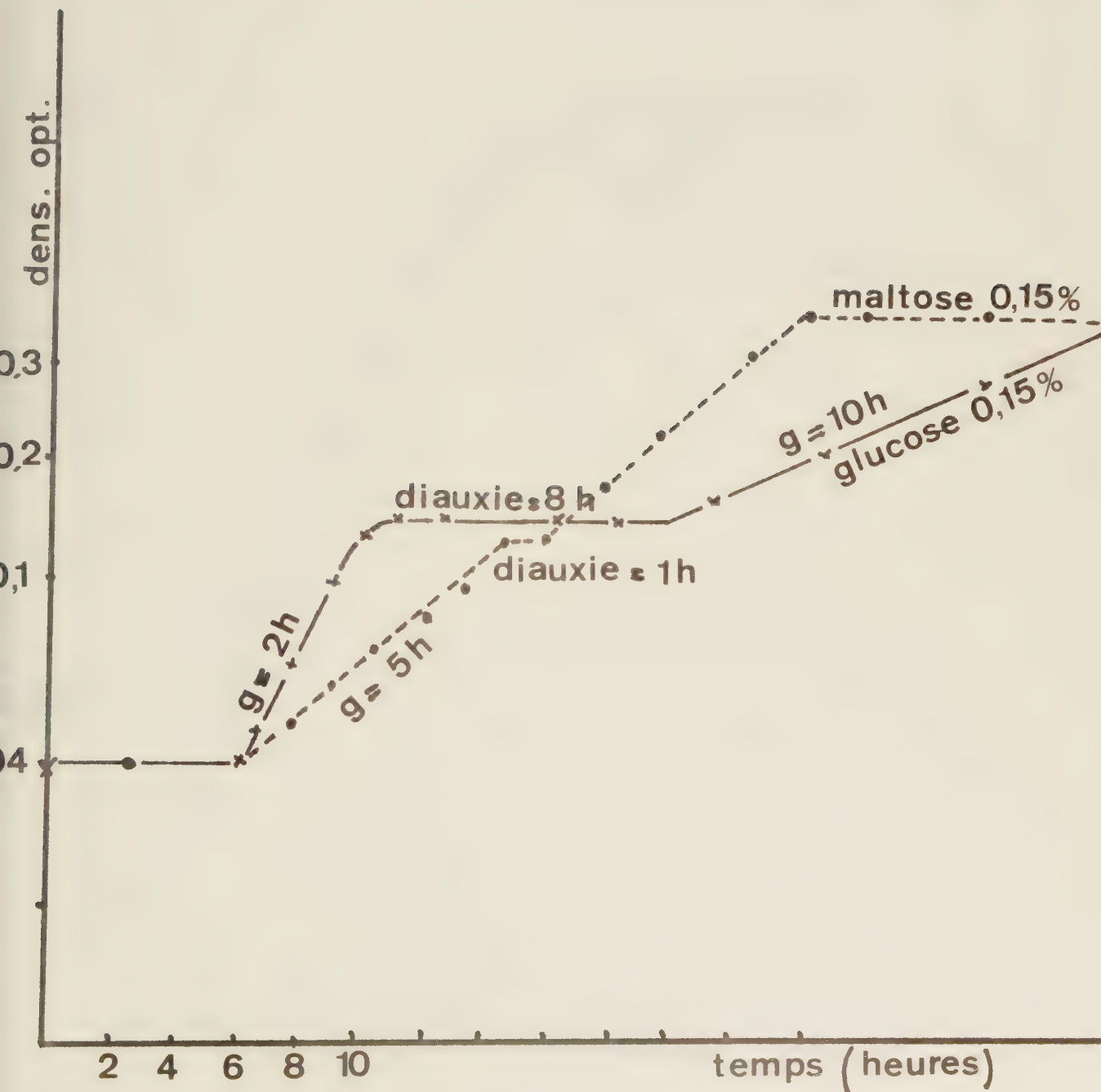


Figure n°14 : Influence du substrat hydrocarboné sur la croissance de *S. carlbergensis* (levure 306)

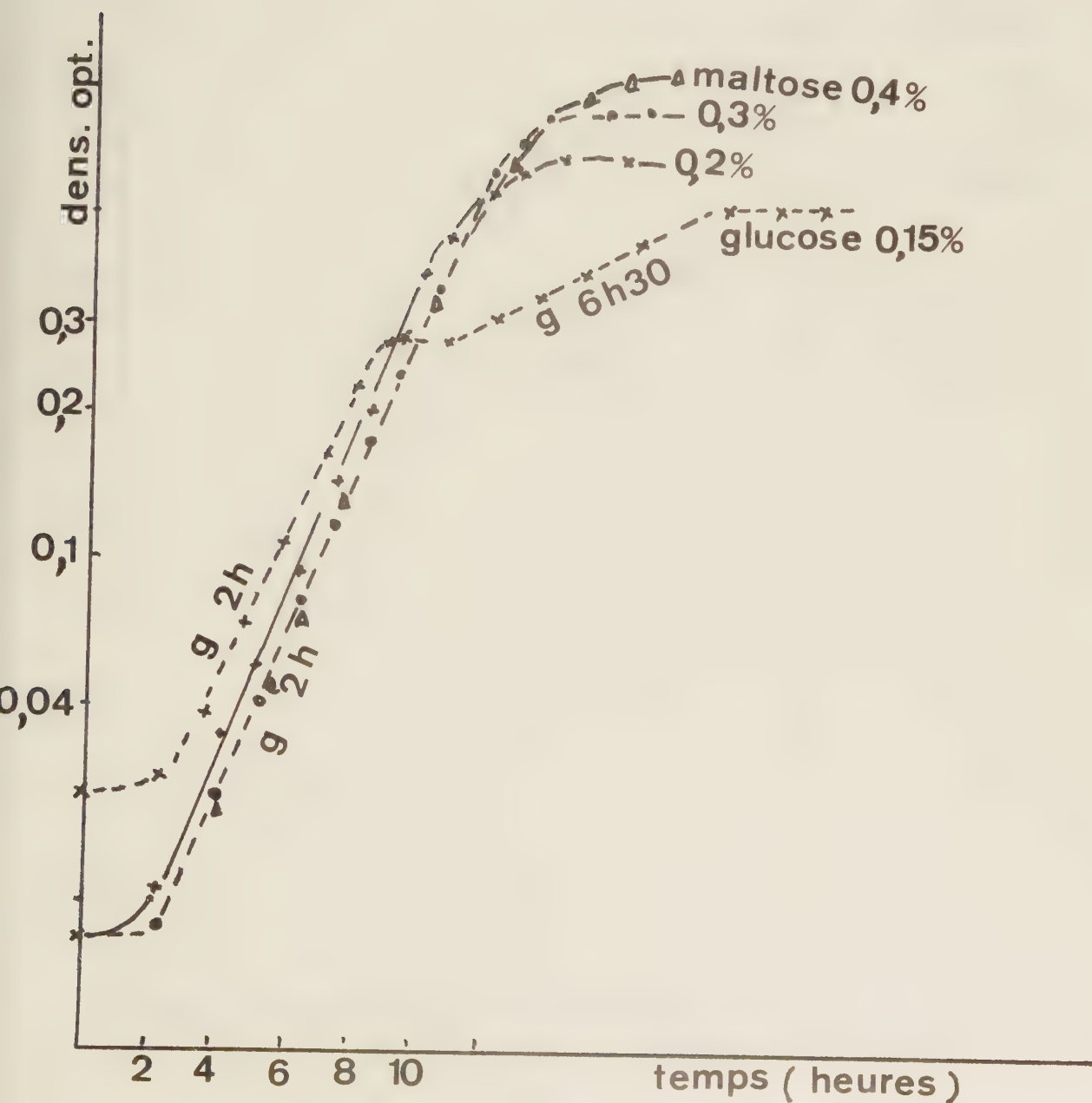
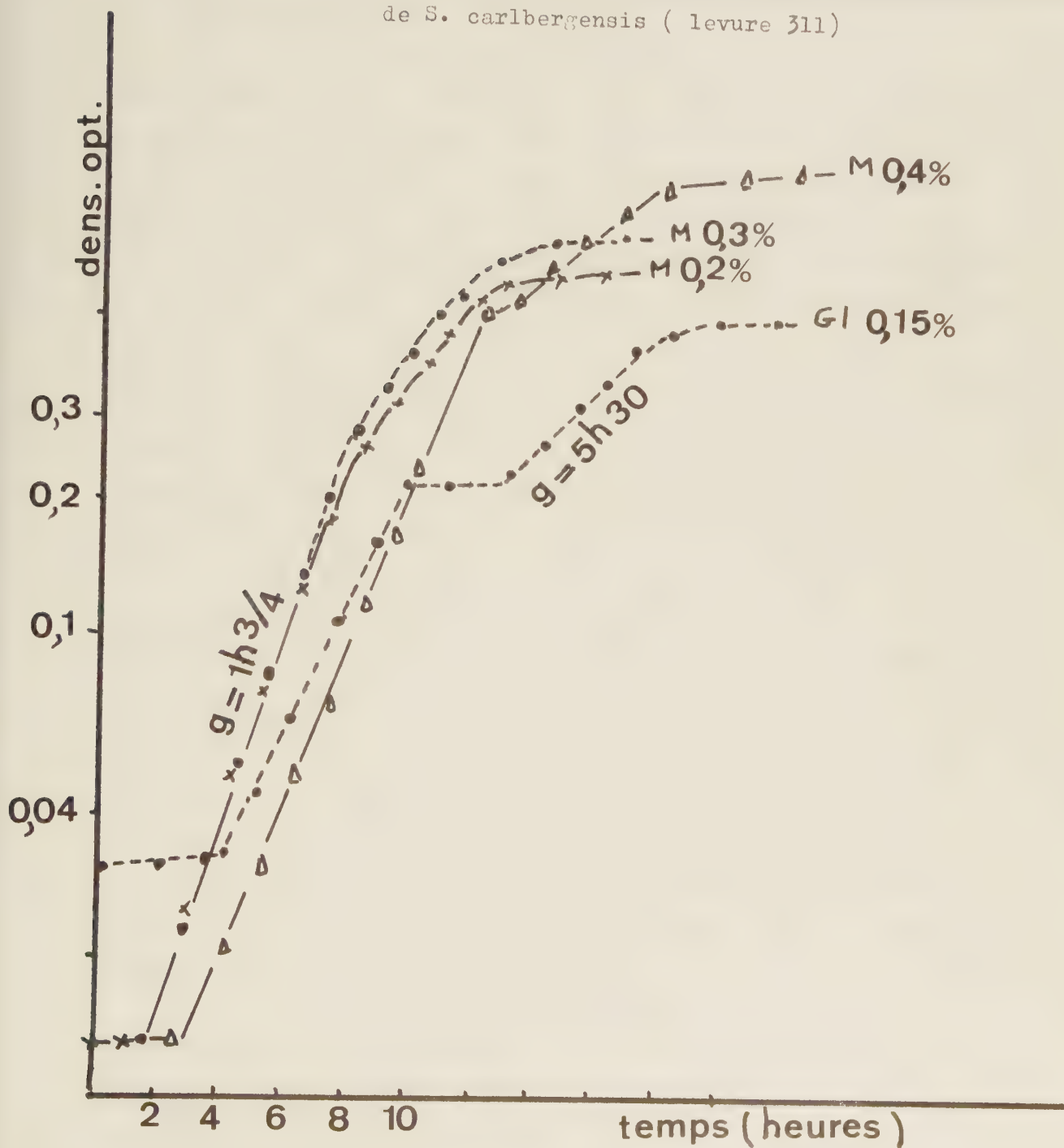


Figure 15 : Influence du substrat hydrocarboné sur la croissance de *S. carlbergensis* (levure 311)



4.1.2- Influence de la nature du substrat carboné sur l'apparition de la diauxie.

Les essais sont effectués avec les levures *S.carlsbergensis* n°167, 306 et 311. Les cellules après préculture sur moût gélosé et croissance non agitée sur 10% de maltose ou 10% de glucose (milieu n°2) sont récoltées par centrifugation stérile et ensemencées sur le milieu n°1 contenant soit 0,15% de glucose, soit 0,15% de maltose. Les résultats sont donnés dans la figure 13. Pour la levure *S.carlsb.*, en croissance sur glucose la levure épuise le sucre par fermentation avec un temps de génération (tmg) de deux heures. Après un arrêt de la croissance de 8 heures, l'éthanol accumulé est respiré avec un temps de génération de 10 heures. La croissance sur maltose par contre présente un simple point d'inflexion. Le temps de génération de cinq heures est le même avant et après le point d'inflexion, celui-ci est situé au niveau du palier de diauxie obtenu pour la croissance sur glucose. Pour les levures 306 et 311, la croissance sur glucose présente un simple point d'inflexion, le temps de génération sur éthanol est de 6h30 et 5h30. L'adaptation à la respiration de l'éthanol est ici beaucoup plus rapide que pour la levure 167. (figures 14 et 15) Pour ces deux *S.carlsb.* 306 et 311, la diauxie disparaît sur maltose 0,2 et 0,3%, elle ne réapparaît qu'avec 0,4% de maltose pour la levure 311. Remarquons également que la vitesse de croissance est semblable sur glucose ou maltose (tmg = 2h), alors que pour la levure 167, le temps de génération est de 2h sur glucose et de 5h sur maltose.

La disparition de la diauxie chez la levure 167, pourrait être une conséquence du ralentissement de la vitesse de croissance en présence de maltose (tmg glucose 0,15% = 2h - tmg maltose 0,15% = 5h). Dans le but de vérifier cette hypothèse,

Figure n° 16 : Croissance comparée de la levure 167 sur maltose 2% et maltose 0,15%.

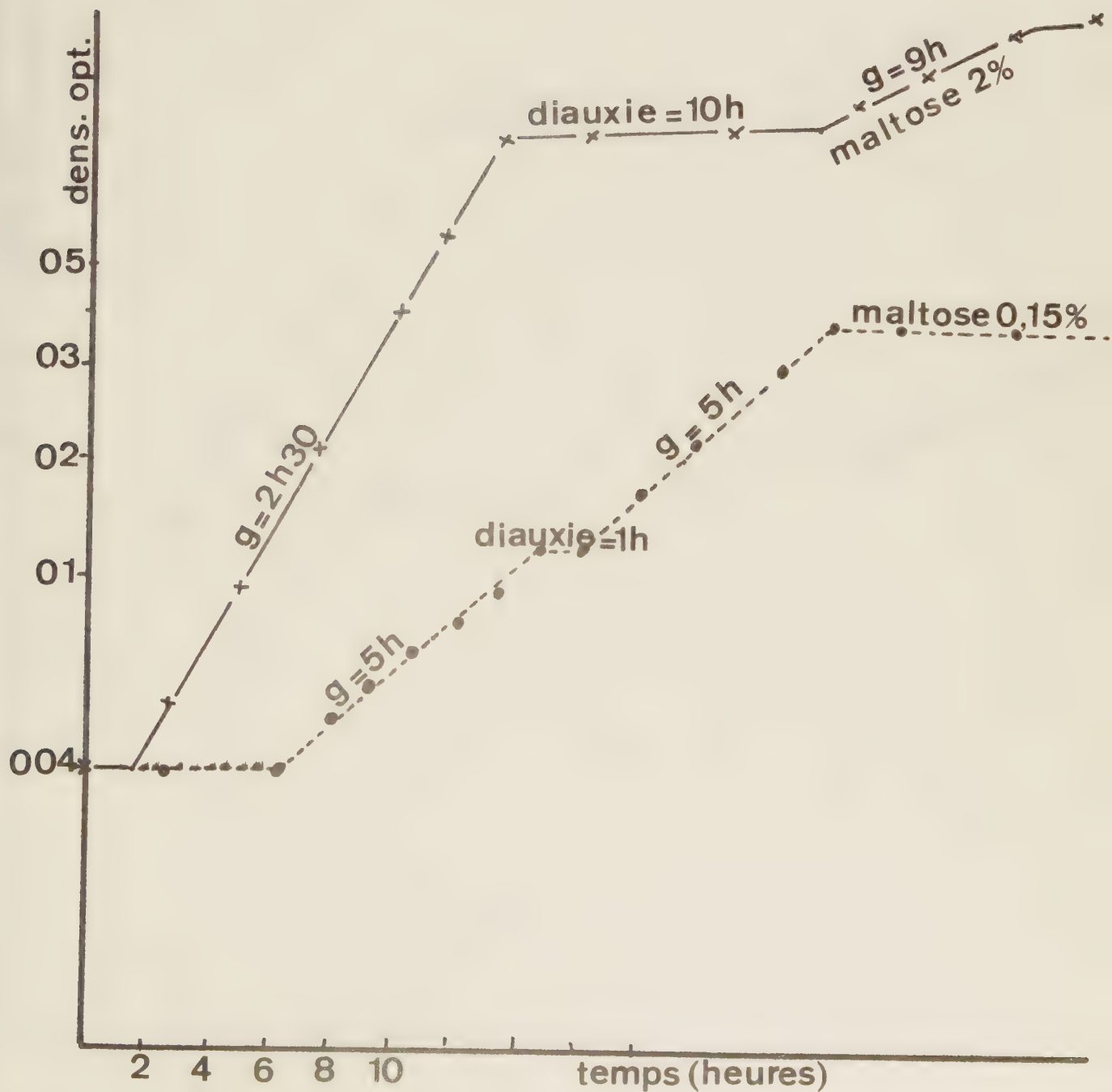
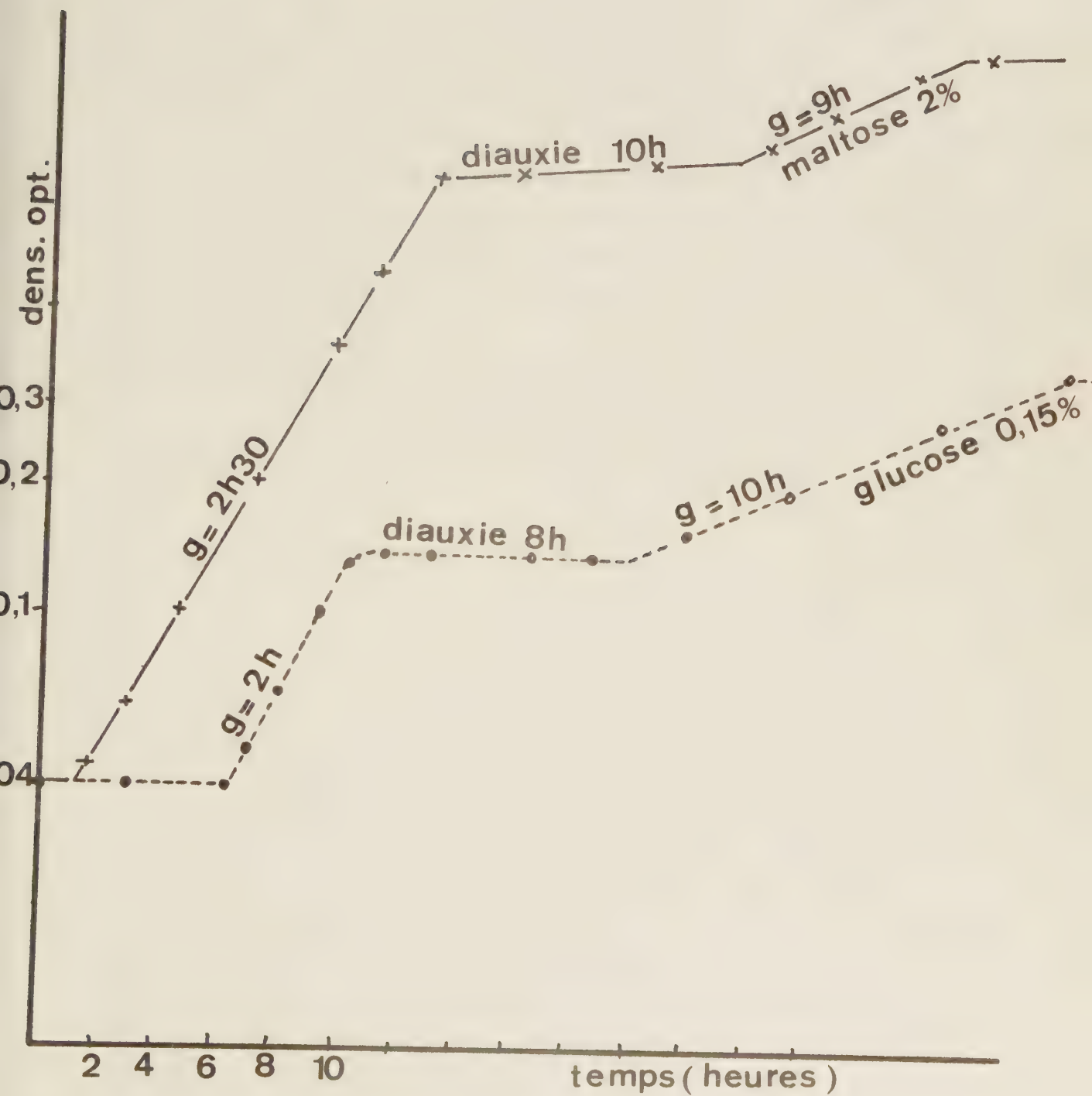


Figure n°17 : Croissance comparée sur maltose 2% et glucose 0,15%.
 Levure 167



nous avons comparé la croissance sur milieu n°1 contenant 2% de maltose et 0,15% de maltose (figures 16 et 17). En croissance sur maltose 2%, l'allure de la courbe est semblable à celle obtenue avec le glucose 0,15%. Le sucre est utilisé par fermentation avec un temps de génération de 2h30, puis nous observons une diauxie de 10 heures, l'éthanol accumulé est ensuite respiré avec un tmg de 9 heures. La vitesse de la croissance dépend donc de la concentration en maltose. La perméase du maltose n'est pas saturée avec une concentration de 0,15%. Cette hypothèse se vérifie si nous effectuons des pouvoirs fermentaires à différentes concentrations en glucose et maltose.

Tableau n°2 $Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose et glucose à différentes concentrations en glucose et maltose Levure 167

concentration en sucre	$Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose	$Q_{CO_2}^{N_2}$ glucose
0,1%	175	240
0,5%	440	275
1%	480	280
4%	515	310

Nous remarquons que si le pouvoir fermentaire sur glucose varie très peu avec la concentration en sucre, le $Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose par contre est 2,5 fois plus élevé avec 0,5% de maltose qu'avec 0,1%. Le Contr'Effet Pasteur moins marqué en croissance sur maltose comparé à la croissance sur glucose serait donc en relation avec la vitesse de croissance de la levure sur ces deux substrats hydrocarbonés. Görts (1967) signale que le maltose est un représentant moins efficace des enzymes respiratoires que le glucose, le même phénomène est observé avec le galactose (Mac Quillan et Halvorson 1962- Tustanoff et Bartley 1962- 1964- Utter 1967). L'adaptation à la respiration sera donc plus rapide, de même

que la synthèse des enzymes du cycle de Krebs et des enzymes du shunt glyoxylique en croissance sur maltose comparée à la croissance sur glucose. Cette hypothèse sera vérifiée au cours des expériences décrites dans les deux paragraphes suivants.

4.1.3- Influence de la nature du substrat carbone sur les variations de la capacité respiratoire au cours de la croissance

Des croissances des levures *S. carlsb.* 167, 306, 311 sont effectuées sur glucose 0,15, maltose 0,15% et maltose 2%, après une préculture en aération limitée sur glucose 2% ou maltose 2%. Les levures sont récoltées à différents moments de la croissance, lavées à l'aide de tampon phosphate KH_2PO_4 14/15. Le pouvoir respiratoire sur glucose, maltose ou éthanol est déterminé à l'aide de la technique manométrique de Warburg avec une concentration en sucre de 0,5% dans la fiole et en déduisant la valeur du QO_2 endogène.

4.1.3.1- Croissance sur glucose 0,15%

Tableau n°3 : Variation du pouvoir respiratoire au cours de la croissance sur glucose 0,15%

	QO_2 glucose		
	levures : 167	306	311
départ	0	0	0
fin 1 ^e phase exponent.	0	44	35
début diauxie	25	61	-
fin diauxie	55	60	-
fin croissance	-	-	132

L'adaptation à la respiration pour la levure 167 se fait pendant la diauxie. Pour les levures 306 et 311, l'adaptation à la respiration est plus rapide, la respiration est déjà importante (70 à 80) pendant la première phase exponentielle. Ces deux

levures présentent une courbe de croissance sur glucose avec un simple fléchissement, analogue à celle obtenue en croissance sur maltose pour la levure 167.

4.1.3.2- Croissance sur maltose 0,15%

Tableau n°4 : Quantité de maltose résiduel dans le milieu de croissance. Levure 167

	quantité maltose dans le milieu en mg / ml
0,050 départ	1,5
0,100 1 ^e phase expon.	0,85
0,125 fin 1 ^e phase	0,64
0,160 fin diauxie	0,49
0,170 début 2 ^e phase expon.	0,44
0,200 2 ^e phase expon.	0,36

Contrairement à ce qui se passe dans le cas du glucose (Haboucha et al 1960), le maltose n'est utilisé que partiellement au moment de la diauxie. Ceci semble devoir indiquer que l'éthanol serait déjà utilisé avant l'apparition de la diauxie. Qu'il en est bien ainsi résulte des résultats exprimés dans le tableau suivant.

Tableau n°5 : Evolution des pouvoirs respiratoires au cours de la croissance sur maltose 0,15%. Levure 167

	QO ₂ glucose	QO ₂ maltose	QO ₂ éthan.
0,100 1 ^e phase exp.	0	0	0
0,130 fin 1 ^e phase exp.	0	44	43
0,160 fin diauxie	55	56	51
0,170 début 2 ^e phase exp.	58	56	46
0,200 2 ^e phase exp.	60	57	56

Les QO₂ atteignent une valeur élevée avant le fléchissement de la courbe de croissance.

4.1.3.3- Croissance sur maltose 2%

Tableau n°6 : Evolution des pouvoirs respiratoires au cours de la croissance sur maltose 2%- Levure 167

	Q O ₂ maltose
0,280 1 ^e phase exp.	15
1 début diauxie	15
1,1 milieu diauxie	45
1,1 2/3 diauxie	52
1,4 2 ^e phase exp.	60
1,6 fin croissance	60

L'adaptation à la respiration de l'éthanol accumulé se fait pendant la diauxie. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus en croissance sur glucose 0,15%.

4.1.4- Influence de la nature du substrat carboné sur la synthèse des enzymes du shunt glyoxylique et de la succinique déshydrogénase.

Les extraits sont réalisés par broyage de la levure en mélange avec du corindon dans un mortier à 0°C.

Tableau n°7- Variations de l'activité de l'isocitritase, de la malate synthase et de la succinique déshydrogénase au cours de la croissance de S.carlb. 167 sur glucose 0,15%.

	isocitritase μM glyox./h/ mg prot.	malate synth. μM CoA/h/ mg prot.	succin. déshydr. μM succ./h/ mg prot.
début diauxie	0	0	0
milieu diauxie	0	-	0
fin diauxie	0,48	1,34	1,57
début 2 ^e phase exp	1,75	3,4	5,36
milieu 2 ^e phase	3,04	5,2	10,4
croiss. éthan. 0,05%	6	-	10

Ces enzymes commencent à être synthétisées en fin de diauxie et leur activité atteint une valeur maximum au cours de la deuxième phase exponentielle.

Tableau n°8 : Variations de l'activité de l'isocitritase, de la malate synthase et de la succinique déshydrogénase au cours de la croissance de *S.carlb.* sur maltose 0,15%

	isocitritase $\mu\text{M glyox.}/\text{h}/$ mg prot.	malate synth. $\mu\text{M CoA}/\text{h}/$ mg prot.	succin. déshydr. $\mu\text{M succ.}/\text{h}/$ mg prot.
1 ^e phase exp.	0	0,8	0
diauxie	0	2	0
début 2 ^e phase exp	1,41	2,3	0,60
milieu 2 ^e phase	1,72	2,5	1
fin 2 ^e phase exp.	2,08	2,5	1,15

La diauxie n'étant que d'une heure un seul échantillon a été prélevé au milieu de celle-ci.

Tableau n°9 : Variations de l'activité de l'isocitritase et de la malate synthase au cours de la croissance de *S.carlb.* 167 sur maltose 2%

	isocitritase $\mu\text{M glyox.}/\text{h}/\text{mg prot.}$	malate synthase $\mu\text{M CoA}/\text{h}/\text{mg prot.}$
1 ^e phase exp.	0	0
début diauxie	0	0
milieu diauxie	0,1	1,05
fin diauxie	3,1	1,8
2 ^e phase exp.	8,1	6

L'évolution des enzymes du shunt glyoxylique et de la succinique déshydrogénase est parallèle en culture sur glucose 0,15% et

maltose 2%. Ces enzymes commencent à être synthétisées en fin de diauxie et leur activité spécifique atteint une valeur maximum à la fin de la deuxième phase exponentielle de croissance. En croissance sur maltose 0,15%, l'activité de ces enzymes ne devient significative qu'au cours de la deuxième phase exponentielle. Les valeurs obtenues sont plus faibles. Par contre, en croissance sur maltose 2%; les valeurs sont comparables avec celles obtenues lors de la croissance sur glucose 0,15%. Les valeurs faibles en croissance sur maltose 0,15% pourraient s'expliquer par la quantité de maltose résiduel après la diauxie et la quantité moindre d'éthanol formée. Le maltose n'est utilisé qu'à 30% soit environ 0,05% au moment de la diauxie. C'est donc bien le maltose résiduel qui empêche une dérépression totale des enzymes du shunt glyoxylique et de la succinique déshydrogénase. La concentration en maltose est en effet encore de 0,036% au cours de la deuxième phase exponentielle de croissance. En croissance sur maltose 2%, l'épuisement complet du substrat carboné implique que seul l'éthanol est utilisé au cours de la deuxième phase exponentielle. Dans ce cas, l'activité des enzymes du shunt glyoxylique et de celle de la succinique déshydrogénase atteignent alors des valeurs proches de celles trouvées en fin de croissance sur glucose 0,15% ou encore de celles obtenues après croissance sur éthanol.

4.1.5- Conclusions et discussion de la première partie.

Depuis les travaux de Wiame (1957), d'Aubert (1960) et de Vanderwinkel (1960), nous savons que le cycle de Krebs constitue la voie principale d'oxydation chez la levure. Ce cycle joue à la fois un rôle énergétique et biosynthétique. En anaérobiose ou pour des concentrations en glucose supérieures à $6 \cdot 10^{-3} \text{M}$, la répression catabolique diminue partiellement ou totalement la synthèse de la succinique

déshydrogénase et le cycle devient alors essentiellement biosynthétique.

L'adaptation à la respiration se passe d'une manière différente chez *S.cerevisiae* et *carlbergensis*. (Haboucha et al 1960). La croissance sur glucose 0,15 %, se caractérise chez ces deux levures par une utilisation du sucre par fermentation (Polakis 1965- Yayaraman 1966). Chez *S.carlbergensis*, après une diauxie due à l'épuisement du sucre, la levure continue sa croissance en oxydant l'éthanol accumulé et il se produit en même temps, une dérégulation des enzymes du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique. Tandis que chez *S.cerevisiae*, aucune diauxie n'est observée. Ce phénomène s'explique par une oxydation de l'éthanol formé et une dérégulation plus rapide des enzymes respiratoires. Ceci a également comme conséquence une vitesse de croissance plus rapide sur éthanol.

Nous avons pu vérifier par les expériences décrites dans la première partie de ce travail la différence de sensibilité à la répression catabolique chez *S.cerevisiae* et *carlbergensis*. Chez les *S.cerevisiae* étudiés, aucune diauxie n'est constatée. Chez *S.carlbergensis*, la durée de la diauxie est très différente suivant les souches. Elle varie de 1h30 pour *S.carlb.* 306-311- 339 à 13h30 pour *S.carlb.* 337. Dans le cas d'une diauxie courte, l'adaptation à la respiration a lieu déjà avant l'arrêt de la croissance. Le ContrEffet Pasteur est donc moins marqué chez ces levures.

La répression catabolique des enzymes respiratoires est également influencée par la nature du substrat carboné utilisé par les levures. Les travaux de Mac Quillan et Halvorson (1962), Tustanoff et Bartley (1962-1964), Görts (1967), Van Wijk (1968) avaient déjà signalé que le galactose était un répresseur moins efficace des enzymes respiratoires que le glucose. Görts (1967-1971)

indique un cas semblable pour le maltose. Dans cette partie du travail, nous avons également étudié la répression des enzymes respiratoires par le maltose chez *S. carlsb.* 167. Pour cette levure, la croissance sur glucose 0,15% se caractérise par un temps de génération de deux heures, une diauxie de huit heures et un temps de génération de dix heures sur éthanol. Avec le maltose 0,15%, par contre, la courbe de croissance présente une diauxie d'une heure et le temps de génération de 5 heures ne varie pas avant et après la diauxie. Sur maltose 2%, la courbe de croissance est semblable à celle obtenue avec le glucose 0,15%. La perméase du maltose n'est pas saturée avec 0,15% de sucre, ce qui expliquerait une croissance plus lente et un Contr'Effet Pasteur moins marqué. Des mesures du pouvoir respiratoire montrent une adaptation plus rapide à l'oxydation de l'éthanol formé, lorsque la croissance est réalisée sur maltose. Des valeurs élevées sont déjà obtenues avant le fléchissement de la courbe alors que le maltose est encore présent à raison de 0,075%. Avec le maltose 2%, tout comme avec le glucose 0,15%, l'adaptation à la respiration de l'éthanol se fait pendant la diauxie.

Les activités des enzymes : succinique déshydrogénase, isocitritase et malate synthase de cellules provenant de la 2^e phase de croissance exponentielle sur maltose 0,15% sont inférieures aux activités des mêmes enzymes qui viennent de cellules en croissance sur glucose 0,15% et récoltées dans les mêmes conditions. Ces valeurs plus faibles pourraient être dûes au maltose résiduel encore restant dans le milieu de croissance après la diauxie et à une quantité moindre d'éthanol formée. Le maltose encore présent à raison de 0,05% empêcherait une dérégulation totale de la succinique déshydrogénase et des enzymes du shunt glyoxylique. Par contre, en croissance sur maltose 2%, le sucre est complètement utilisé au moment de la

diauxie, l'activité de ces enzymes rejoint alors celle obtenues en fin de croissance sur glucose 0,15% ou sur éthanol 0,05%.

Ces résultats obtenus en croissance sur maltose peuvent être comparés à ceux obtenus avec le galactose, également répresseur catabolique moins efficace des enzymes respiratoires. Les travaux de Tustanoff et Bartley (1962- 1964) et de Van wijk (1968) montrent une valeur de la capacité respiratoire plus importante en croissance sur galactose qu'en présence de glucose, ainsi que des activités des enzymes : aconitase, isocitrique déshydrogénase (NAD) et succinique déshydrogénase trois fois plus élevées.

4.2- CHAPITRE 2- REPRESSION DE LA MALTOZYMASE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ET CARLSBERGENSIS.

4.2.1- Repression catabolique de la maltozymase chez les différentes souches de S.cerevisiae et carlsbergensis.

Lors de la régulation d'une chaîne métabolique deux mécanismes peuvent intervenir :

1°/ régulation de l'activité de l'enzyme : le produit terminal d'une chaîne de biosynthèse inhibe l'activité de la première enzyme de cette chaîne : rétroinhibition. Pour les enzymes du catabolisme, cette régulation est appelée inhibition catabolique. C'est un contrôle exercé par le glucose sur l'activité de la perméase ou sur celle de la première enzyme de la chaîne. Dans le cas que nous étudions, il s'agit d'une inhibition de la perméase du maltose (2).

2°/ régulation de la synthèse des protéines enzymatiques :

induction : le substrat induit les enzymes participant à son métabolisme. Dans le cas qui nous occupe ici, le maltose induit la synthèse de la perméase et de l'alpha-glucosidase.

répression : le produit terminal d'une chaîne métabolique inhibe la synthèse des enzymes de cette chaîne. Pour les enzymes du catabolisme, on parle de répression catabolique, le glucose ou un autre source de carbone facilement métabolisable réprime la synthèse de certaines enzymes. Ici le glucose réprime la synthèse de la perméase du maltose et de l'alphaglucosidase (1).

Ces différents systèmes de régulation seront représentés graphiquement de la manière suivante :



La courbe 1 montre un arrêt de la synthèse des enzymes : répression. Au cours de la croissance de la levure, les enzymes déjà synthétisées sont diluées. La courbe 2 montre un arrêt de la synthèse des enzymes, suivi d'une perte d'activité des enzymes préformées : inhibition ou désadaptation. La courbe 3 montre que le glucose ajouté est sans effet sur la synthèse et l'activité des enzymes. La pente de la droite exprime le taux différentiel de synthèse des enzymes, c'est-à-dire ici la variation de la vitesse de fermentation du maltose en fonction de la masse cellulaire. Nous pourrions ainsi classer les levures en trois groupes :

1/ levures qui fermentent le maltose d'une façon constitutive (courbe 3) et sont insensibles à la répression catabolique par le glucose.

2/ levures dont la fermentation du maltose est réprimée par le glucose (courbe 1).

3/ levures qui se désadaptent à la fermentation du maltose en présence de glucose. Dans ce cas, il y a à la fois arrêt de la synthèse et inactivation partielle de l'activité des enzymes préformées (courbe 2).

L'étude de la cinétique d'induction de la maltosylase (perméase du maltose + alphaglucosidase) en absence de

multiplication cellulaire révèle un comportement très différent des levures hautes ou *S.cerevisiae* et basses ou *S.carlbergensis*. L'adaptation à la fermentation du maltose est généralement beaucoup plus rapide dans le cas des levures hautes.

4.2.1.1 - reproductibilité des mesures

Au cours de la croissance sur maltose

Les expériences ont été réalisées avec la levure *S.carlb.* 338 cultivée sur maltose 2%, yeast extract 0,5% (milieu 2). La culture estensemencée à raison de $1,66 \times 10^5$ cellules / ml ou 0,015mg de poids sec / ml. Les prises se font au cours de la croissance exponentielle. La levure est lavée à l'eau physiologique puis remise en suspension dans le tampon phosphate M/15 pH 4,5. La détermination du pouvoir fermentaire ($Q_{CO_2}^{N_2}$) se fait par la technique manométrique de Warburg avec une concentration en levure de 1,5 à 2mg de poids sec par essai et une quantité de maltose de 4% dans la fiole.

Tableau n°10- Reproductibilité des résultats - Activité de la maltozymase au cours de la croissance sur maltose 2%.

	dens.opt. récolte	poids sec mg/ml	nb.cell. /ml	$Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose erreur	
				microl CO ₂ /h/mg poids sec	en %
1 ^e culture	0,140	0,21	$2,34 \cdot 10^6$	411	6,5
2 ^e culture	0,140	0,21	$2,34 \cdot 10^6$	419	
	0,210	0,315	$3,5 \cdot 10^6$	400	
	0,370	0,55	$6,18 \cdot 10^6$	448	
	0,480	0,72	$8 \cdot 10^6$	445	
3 ^e culture	0,095	0,143	$1,59 \cdot 10^6$	453	9
4 ^e culture	0,050	0,075	$0,83 \cdot 10^6$	413	
	0,090	0,135	$1,5 \cdot 10^6$	438	

5 ^e culture	0,100	0,150	$1,67.10^6$	370	12
	0,155	0,232	$2,58.10^6$	357	
	0,410	0,617	$6,83.10^6$	361	
	0,600	0,9	10.10^6	407	
6 ^e culture	0,160	0,240	$2,67.10^6$	404	3
	0,350	0,525	$5,85.10^6$	413	
	0,610	0,915	$10,2.10^6$	417	
7 ^e culture	0,165	0,249	$2,74.10^6$	389	5,5
	0,420	0,631	7.10^6	388	
	0,540	0,831	9.10^6	368	

Les valeurs extrêmes trouvées pour les pouvoirs fermentaires sont 357 et 453, l'erreur est donc de 15,5%.

Au cours de la régulation de la maltozymase par le glucose.

Les expériences ont été réalisées avec deux levures dont la maltozymase est désactivée par le glucose : les levures *S.carlsb.* 167 et *S.cerev.* 123. Les levures sont cultivées sur maltose 2% yeast extract 0,5% en culture aérée. Lorsque la croissance a atteint la densité optique de 0,200 (0,3mg de poids sec /ml) le glucose est ajouté à la culture à une concentration de 10%.

Tableau n°11 : Reproductibilité des résultats au cours de la répression de la maltozymase par le glucose.

maltozymase exprimée en microlitres de CO₂ dégagés /h/ ml de culture.

levure 167	croiss.malt.	après 2h	après 4h
		d'incub.gluc. 10%	d'incub. gluc. 10%
1 ^e expérience	114	90	31
2 ^e expérience	150	72	41
3 ^e expérience	113	61	25
4 ^e expérience	127	55	25
erreur	25%	39%	39%

Figure n° 18 : Répression de la maltozymase par le glucose chez *S. cerevisiae* et *carlbergensis*.

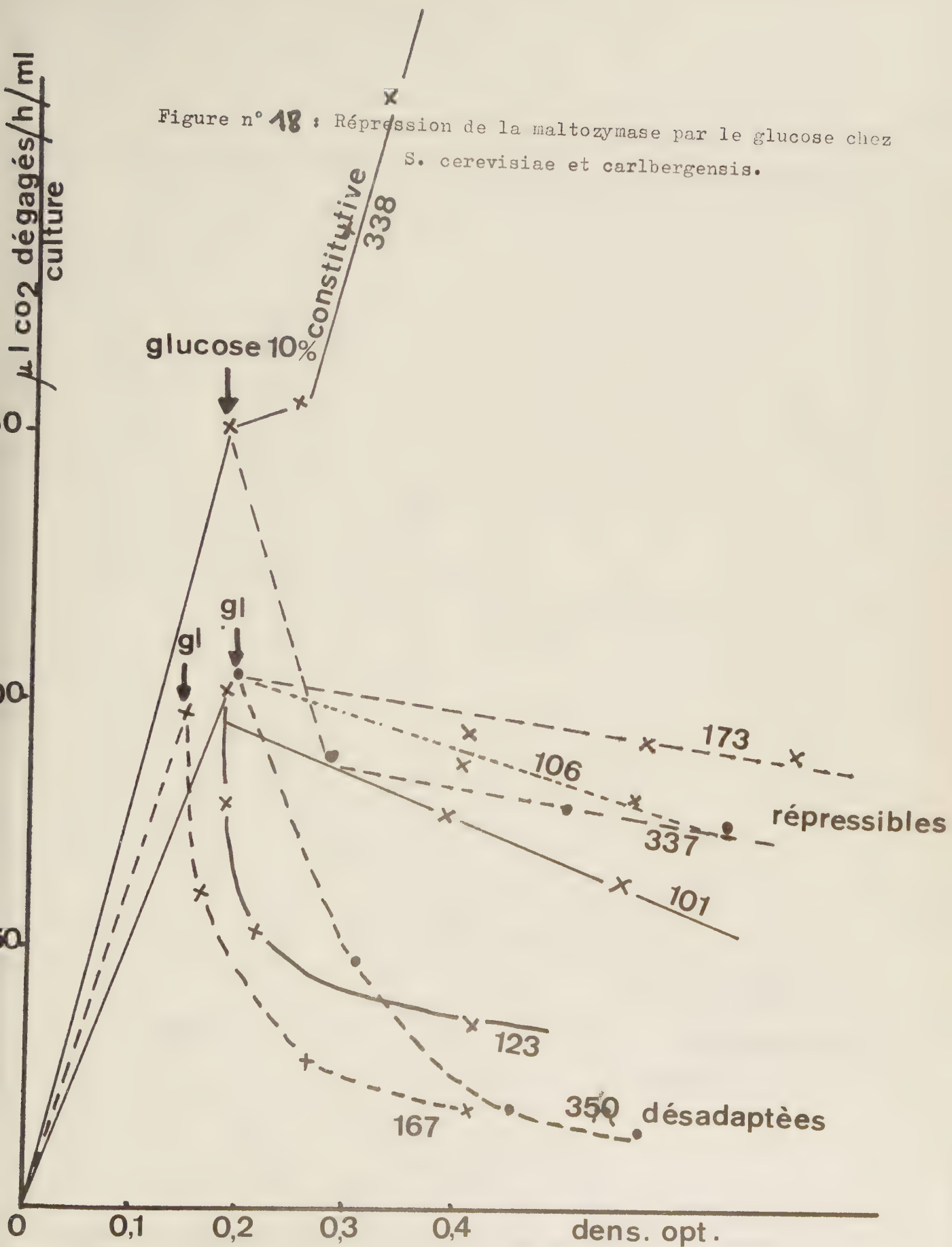
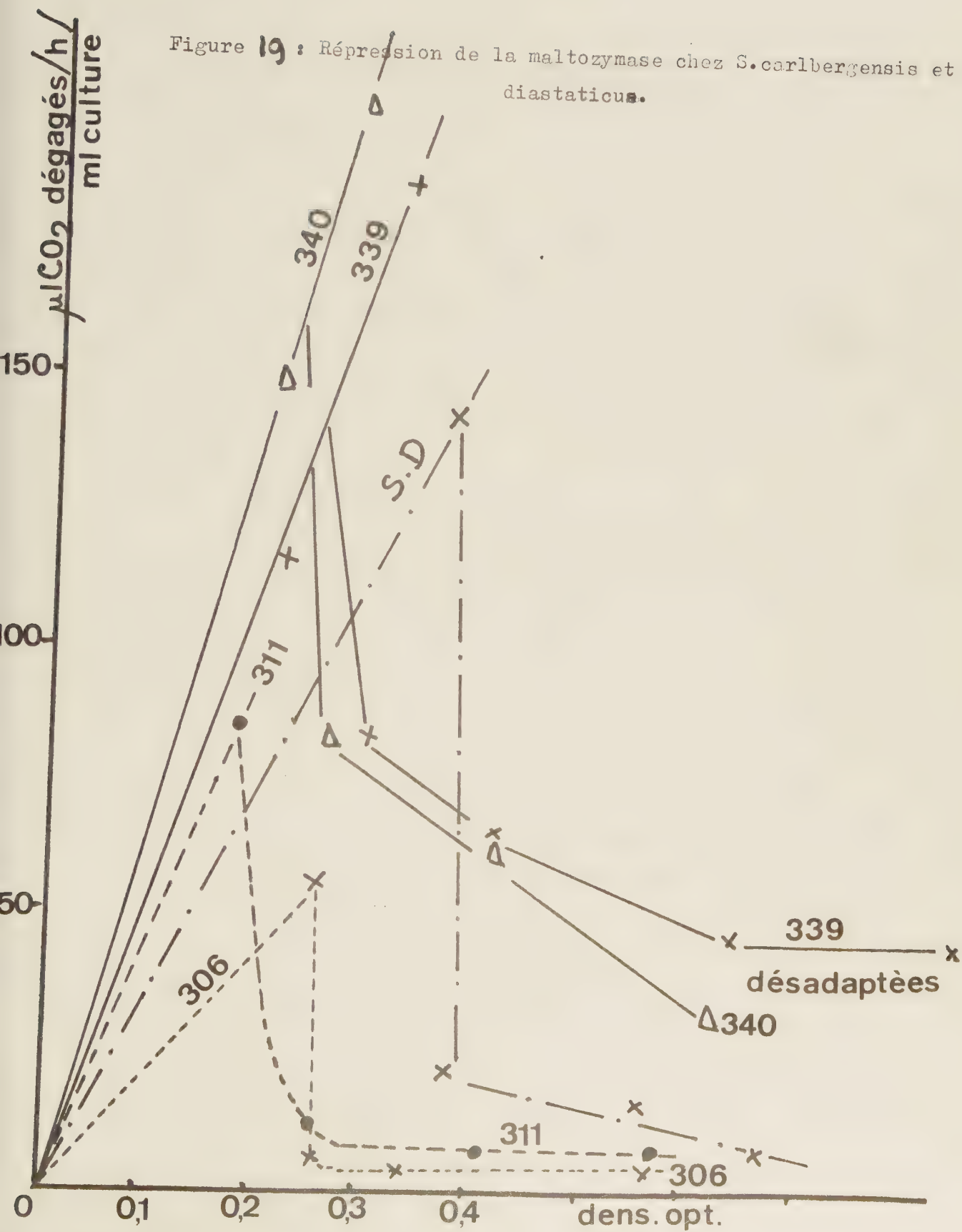


Figure 19 : Répression de la maltosylase chez *S.carlbergensis* et *diastaticus*.



levure 123

1 ^e expérience	93	21	18
2 ^e expérience	78	24	14
erreur	16%	12%	22%

Malgré une erreur expérimentale qui peut dans certains cas atteindre 40%, la technique permet d'évaluer la sensibilité d'une levure à la répression catabolique. Ainsi le comportement d'une levure dont la maltozymase est désactivée après traitement par le glucose reste inchangée d'une expérience à l'autre. Il en est de même pour les levures répressibles ou insensibles au glucose.

4.2.1.2- évolution de la maltozymase

La répression catabolique de la maltozymase par le glucose a été étudiée pour les différentes souches de *S.cerevisiae* n° 101-106-123-173, de *S.carlsbergensis* n° 167-306-311-337-338-339-340-350 et pour une *S.diastaticus* : S.D. La levure est cultivée sur maltose 2% yeast extract 0,5% (milieu n°2), le glucose est ajouté au milieu de la phase exponentielle de croissance. La levure est récoltée pendant la croissance sur maltose et après l'addition de glucose. Les résultats sont exprimés dans les figures 18 et 19. Nous indiquons par glucose 10% et une flèche ou uniquement par une flèche le moment à partir duquel le pouvoir fermentaire mesuré provient de levures en croissance sur maltose plus glucose.

Parmi les levures étudiées, les paramètres suivants seront variables d'une souche à l'autre :

1°/ le taux différentiel de synthèse de la maltozymase représenté graphiquement par la tangente de l'angle alpha.

2°/ la répression catabolique de la maltozymase par le glucose.

L'activité de la maltozymase : perméase du maltose et alphaglucosidase.

sidase peut être insensible à la présence de glucose : levure *S.carlb.* 338, réprimée par le glucose : levures *S.cerev.* 101-106-173 ou désactivée : levures *S.cerev.* 123 et *S.carlb.* 167-306-311-337-339-340-350.

Nous remarquons que le taux de répression catabolique exercé par le glucose sur la maltozymase varie avec la souche de levure. Ce taux variable pourrait être mis en relation avec la concentration intracellulaire en 3-5 AMP cyclique. En effet, Monod (1968), Perlman et Pastan (1969) et Ullmann (1971) ont montré le rôle important joué par le 3-5 AMP cyclique dans la répression catabolique. Le 3-5 AMP cyclique étant capable de supprimer la répression catabolique, des levures insensibles au glucose (*S.carlb.* 338) devraient avoir un taux intracellulaire en AMP cyclique plus élevé que celles dont la maltozymase est désactivée par le glucose (*S. cerev.* 123- *S.carlb.* 167-306-311- 337- 339-340-350 - *S.diast.* *S.D.*)

Il est important de noter que le maltose utilisé lors des mesures manométriques au Warburg doit être exempt de glucose. En effet, la présence de traces de glucose, permet une adaptation très rapide de la maltozymase. Il est dans ce cas difficile d'estimer le taux de répression ou d'inhibition catabolique (voir tableau n° 12). La levure est récoltée au cours de la croissance sur maltose et après addition du glucose. Le pouvoir fermentaire est déterminé par une mesure manométrique, le substrat étant : 1°/ 0,75% de maltose Merck exempt de glucose
2°/ 0,75% de maltose + 0,15% de glucose
3°/ 0,75% de maltose + 0,075% de glucose
4°/ 0,75% de maltose + 0,015% de glucose

Tableau n° 12 : Influence du glucose au cours de la détermination manométrique de la maltozymase.

	D.O maltozymase = 1 CO ₂ dégag. /h/ml cult.				
	recolt.	0,075%M	0,075%M+ 0,075%M+ 0,075%M+		
			0,15%G	0,075%G	0,015%G
maltose 2%	0,185	125	110	103	85
2h après 1'	0,280	113	154	93	117
addit.gluc.					
4h après 1'	0,350	54	-	145	124
addit.gluc.					

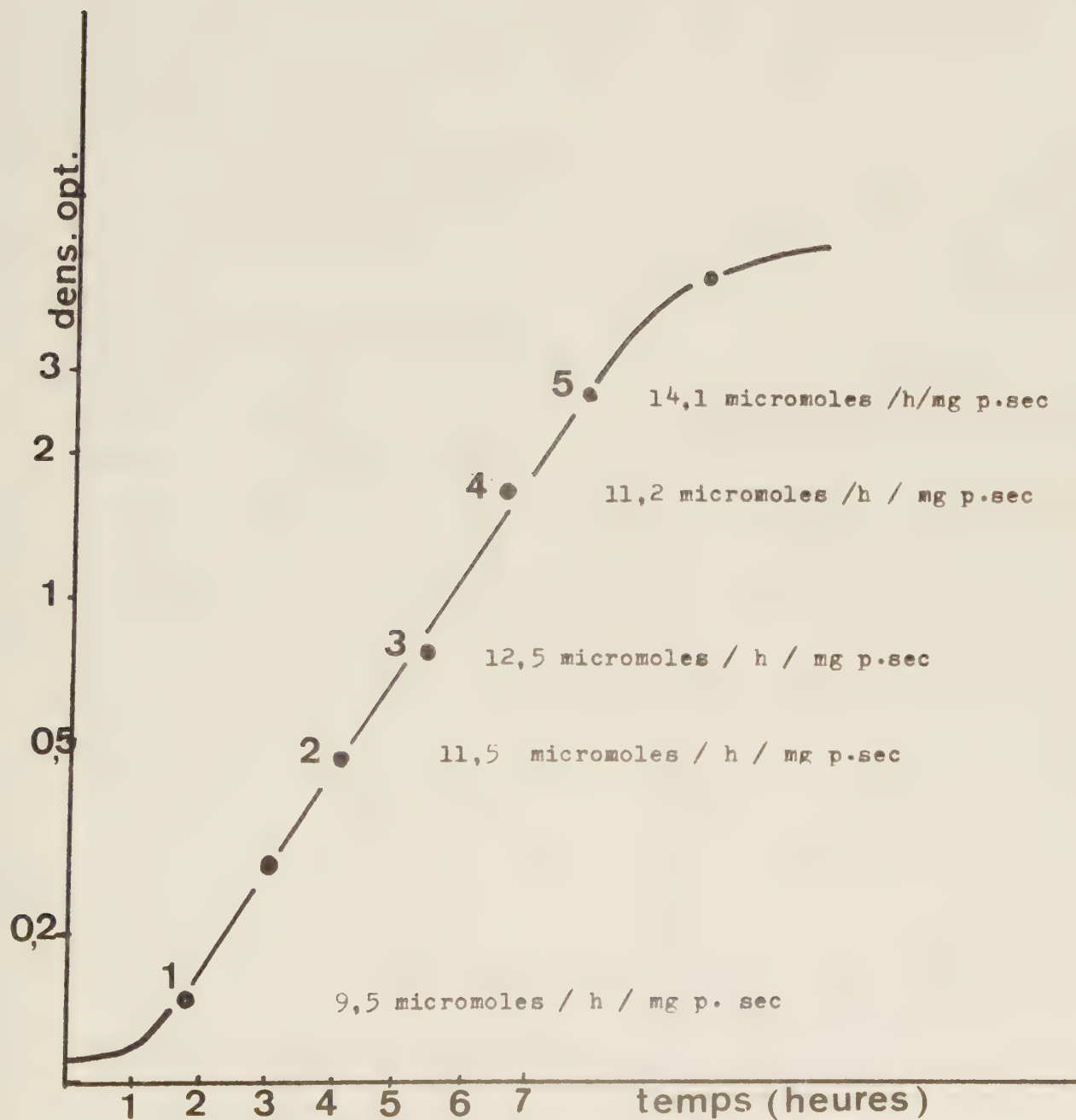
Si la désadaptation fait intervenir la formation d'une protéine comme dans le cas de la répression de l'ornithine transcarbamylase par l'arginine (Béchet 1965), l'addition d'actidione devrait empêcher la désadaptation de la maltozymase par le glucose. L'actidione est en effet un inhibiteur de la synthèse protéique (Kerridge 1958- Ennin et Lubin 1964- Siegel et Sisler 1964).

Tableau n°13- Action de l'actidione sur la désadaptation de la maltozymase par le glucose - Levure *S.carl.* 167

	Dens.opt.	maltozymase en microlCO ₂ /h/ml cult.	
		sans actid.	avec 1 ppm actid.
croissance sur maltose	0,200	115	115
2h après l'addit. glucose	0,220	93	96
3h après l'addit. gluc.	0,250	-	70
4H après l'addit. glucose	0,350	85	60

L'inactivation de la maltozymase se produit même en présence d'actidione, elle ne s'expliquerait donc pas par la synthèse d'une protéine spécifique et inhibitrice se combinant avec l'enzyme. Par contre Görts (1969) a trouvé pour *S.cerevisiae*

Figure 20 : Activité spécifique de l'alphaglucosidase au cours de la croissance sur maltose 2%.



Hansen une inactivation deux fois plus lente de la perméase du maltose avec actidione que sans actidione. Il attribue cette inactivation plus lente à la participation d'une protéine inhibitrice dans la répression.

4.2.1.3- évolution de l'alphaglucosidase.

Les conditions expérimentales sont celles décrites p.48. La levure est récoltée pendant la croissance sur maltose et l'addition de glucose.

Reproductibilité des résultats

La levure S.carlb. est cultivée sur milieu n°2 et récoltée à différents moments de la croissance. L'alphaglucosidase est mesurée par la méthode Halvorson (voir p.23). L'extrait est réalisé par un cycle de cinq congélations- décongélations. Les résultats sont exprimés dans le tableau n°14 et la figure 20

Tableau n°14 - Activité spécifique de l'alphaglucosidase au cours de la croissance sur maltose 2%- Levure S.carlb. 167

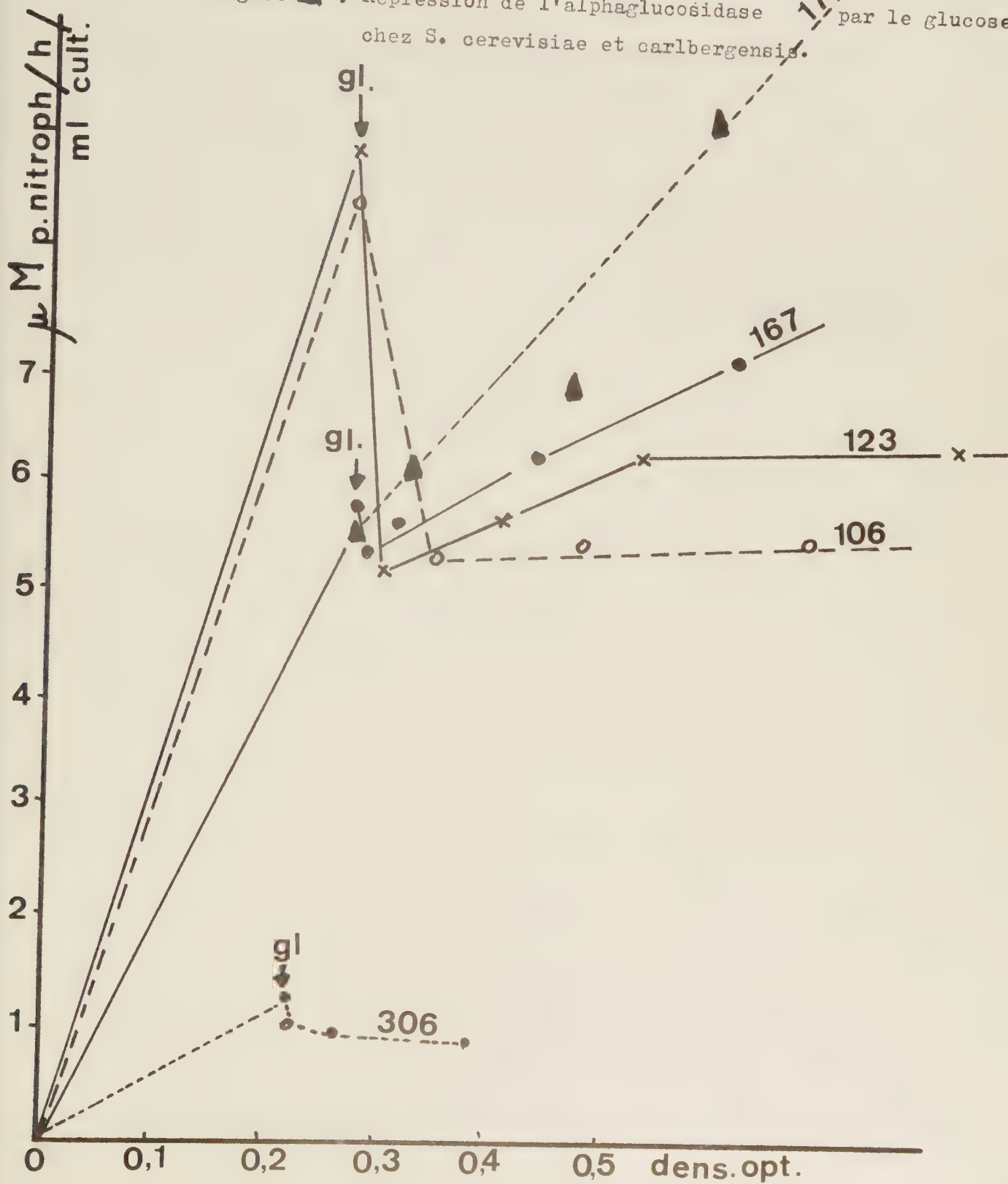
prise	D.O récolte	alphaglucosidase / M p.nitrophénol lib/ h / mg poids sec
1	0,150	9,5
2	0,280	11,5
3	0,770	12,5
4	1,720	11,2
5	2,700	14,1

Pendant la phase exponentielle, l'erreur est de 10,4%. Au début et en fin de phase exponentielle, l'erreur est plus importante (32%). Il est donc important de réaliser les mesures pendant la phase exponentielle.

Evolution de l'alphaglucosidase

Les levures S.carlb. 167 et 306 et S. cerev. 106-123- 173 sont

Figure 20 : Répression de l'alpha-glucosidase par le glucose chez *S. cerevisiae* et *carlbergensis*.



ensemencées sur maltose 2% à densité optique 0,100 ou 0,15mg poids sec /ml, le glucose est ajouté lorsque la croissance atteint densité optique 0,275 ou 0,41mg poids sec / ml. Les résultats sont indiqués dans le tableau n°15 et la figure 21.

Tableau n° 15 : Evolution du taux différentiel de synthèse de l'alphaglucosidase au cours de la répression par le glucose.

levure	D.O récolte	croissance	glucosidase, M p.nitro phénol lib./h/ml culture
167	0,275	maltose	5,7
	0,280	2h après	5,37
	0,310	addit. gluc. 3h " "	5,61
	0,440	4h " "	6,16
	0,620	5h " "	7,15
306	0,275	maltose	1,3
	0,260	30' après	1,05
	0,260	1h après "	1,02
	0,300	1h30 après "	0,97
	0,375	2h après "	0,98
106	0,275	maltose	8,5
	0,350	2h après	5,27
	0,480	1'addit.gluc. 3h après "	5,4
	0,680	4h après "	5,4
123	0,275	maltose	8,5
	0,300	2h après	5,15
	0,410	1'addit.gluc. 3h après "	5,6
	0,530	4h après "	6,25
	0,825	5h après "	6,33

173	0,275	maltose	5,4
	0,325	2h après	6,1
		l'addit.gluc.	
	0,470	3h après "	6,8
	0,600	4h après "	9,35
	0,800	5h après "	11,6

L'alphaglucosidase est insensible au glucose chez la levure 173, repressible chez les levures 106, 123 et 306. Chez la levure 167, la synthèse de l'alphaglucosidase est en partie réprimée, mais ne s'arrête pas complètement. Rappelons que les mesures de la maltozymase : perméase du maltose + alphaglucosidase pour les mêmes levures nous donnaient les résultats suivants ; désactivation de la maltozymase pour les levures 167, 306 et 123, répression pour les levures 106 et 173. Par conséquent, la régulation des enzymes permettant l'utilisation du maltose sera la suivante pour les cinq levures étudiées ;

levure	perméase du maltose	alphaglucosidase
S.carlb. 167	désactivation	partiellement réprimée
306	désactivation	répression
S.cerev. 106	répression	répression
123	désactivation	répression
173	répression	insensible au gluc.

La perméase du maltose est beaucoup plus sensible à l'action du glucose que l'alphaglucosidase. Parmi les levures étudiées, nous n'avons pas rencontré de désactivation de l'alphaglucosidase, mais bien une répression de la synthèse. Görts (1967- 1969) a trouvé des résultats semblables pour *Scerevisiae* Hansen. Pour cette levure également seule la perméase du maltose est désactivée, l'alphaglucosidase n'étant que partiellement réprimée. Halvorson et al (1957)- Harris et Millin (1963) signalent également que

l'enzyme limitant la vitesse de fermentation du maltose est la perméase du maltose.

Les résultats obtenus pour l'alphaglucosidase avec des levures perméabilisées par un cycle de cinq congélations à -60°C et décongélations à $+30^{\circ}\text{C}$ ont été confirmés pour des extraits réalisés à l'appareil à ultra-sons, par éclatement de protoplastes, ainsi que sur des levures perméabilisées à la nystatine. Pour cette étude, nous utiliserons la levure *S.carlsb.* 167. Béchet (1965) trouve pour l'ornithine transcarbamylase une régulation différente de l'arginine en extrait et en cellules perméabilisées. En extrait, l'arginine provoque un arrêt de synthèse de l'ornithine transcarbamylase. En cellules perméabilisées, il y a à la fois arrêt desynthèse et inhibition de l'enzyme existant : désadaptation.

Répression de l'alphaglucosidase par le glucose - extrait aux ultra-sons, éclatement des protoplastes et perméabilisation des cellules à l'aide de nystatine.

Extrait par éclatement des protonlastes (voir technique)

Le temps d'action de l'enzyme lysant provenant de l'estomac de l'escargot *helix pomatia* sur les levures est de 40 minutes.

Un temps d'action plus long conduit à des valeurs plus faibles pour l'alphaglucosidase, exprimée en micromoles de p.nitrophénol libérées / heure / mg de protéines : $40' = 70,6 - 70' = 63,5 - 210' = 47,5$. L'erreur pour plusieurs essais est de 19% pour l'enzyme libre. Pour l'enzyme lié, les résultats sont très variables. Nous ne reprendrons que les valeurs pour l'enzyme libre. Les résultats trouvés pour la répression de l'alphaglucosidase par le glucose : extrait par éclatement des protoplastes, ultra-sons, et perméabilisation des cellules à la nystatine sont repris dans le tableau n°16 et dans la figure 22.

Figure 22 : Répression de l'alphaglucosidase par le glucose.

Levure 167

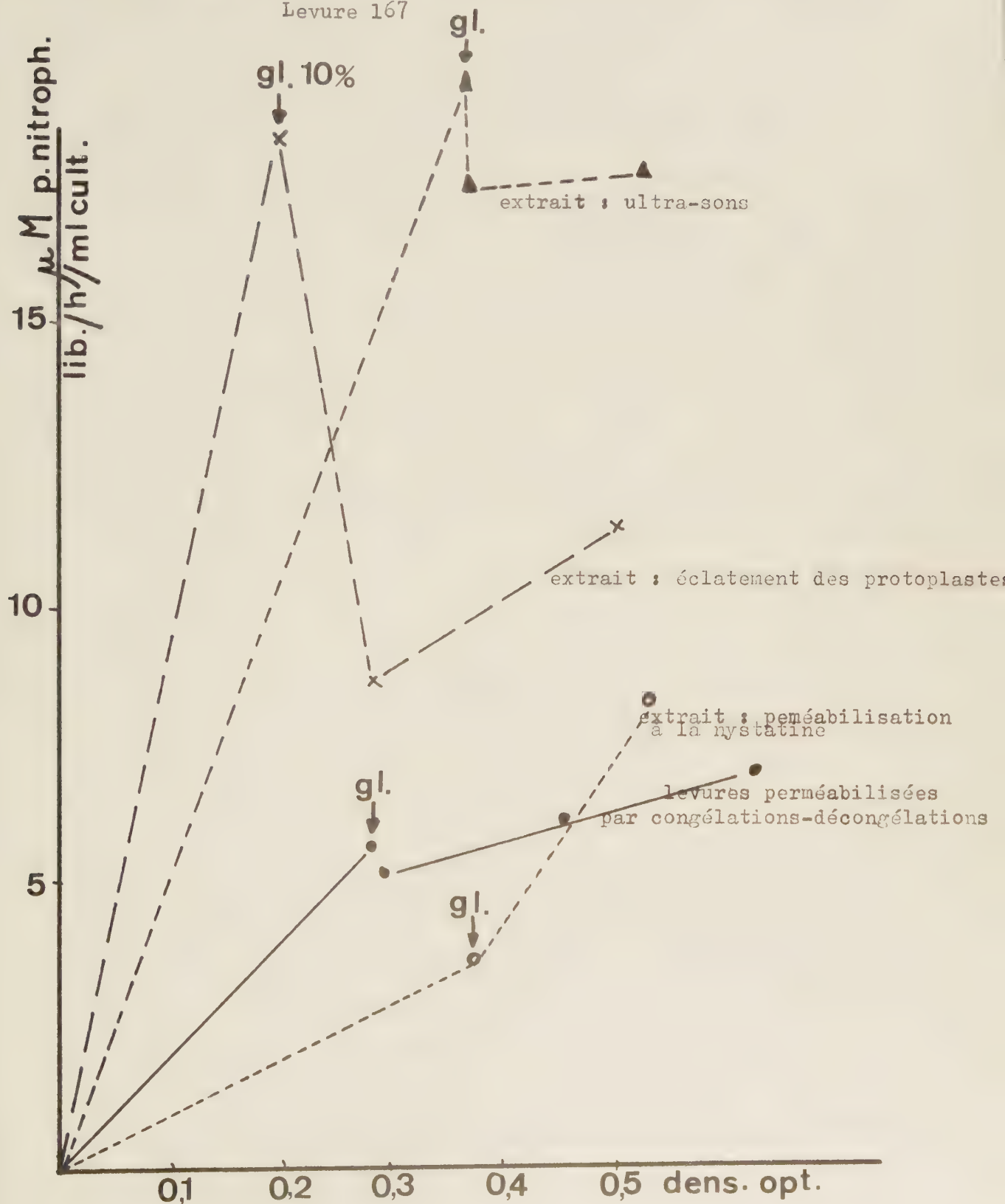


Tableau n° 16 : Répression de l'alphaglucosidase par le glucose - Levure *S.carlsb.* 167

Extrait par éclatement des protoplastes

	D.O récolte	alphaglucosidase en micro-moles p.nitroph./h/ml cult.
croissance sur maltose	0,195	18,4
2h après l'addit. glucose	0,275	8,8
4h1/2 après l'addit. glucose	0,495	11,7

Extrait aux ultra-sons

croissance sur maltose	0,360	19,5
2h après l'addit. glucose	0,360	17,7
4h30 après "	0,520	18

Perméabilisation à la nystatine

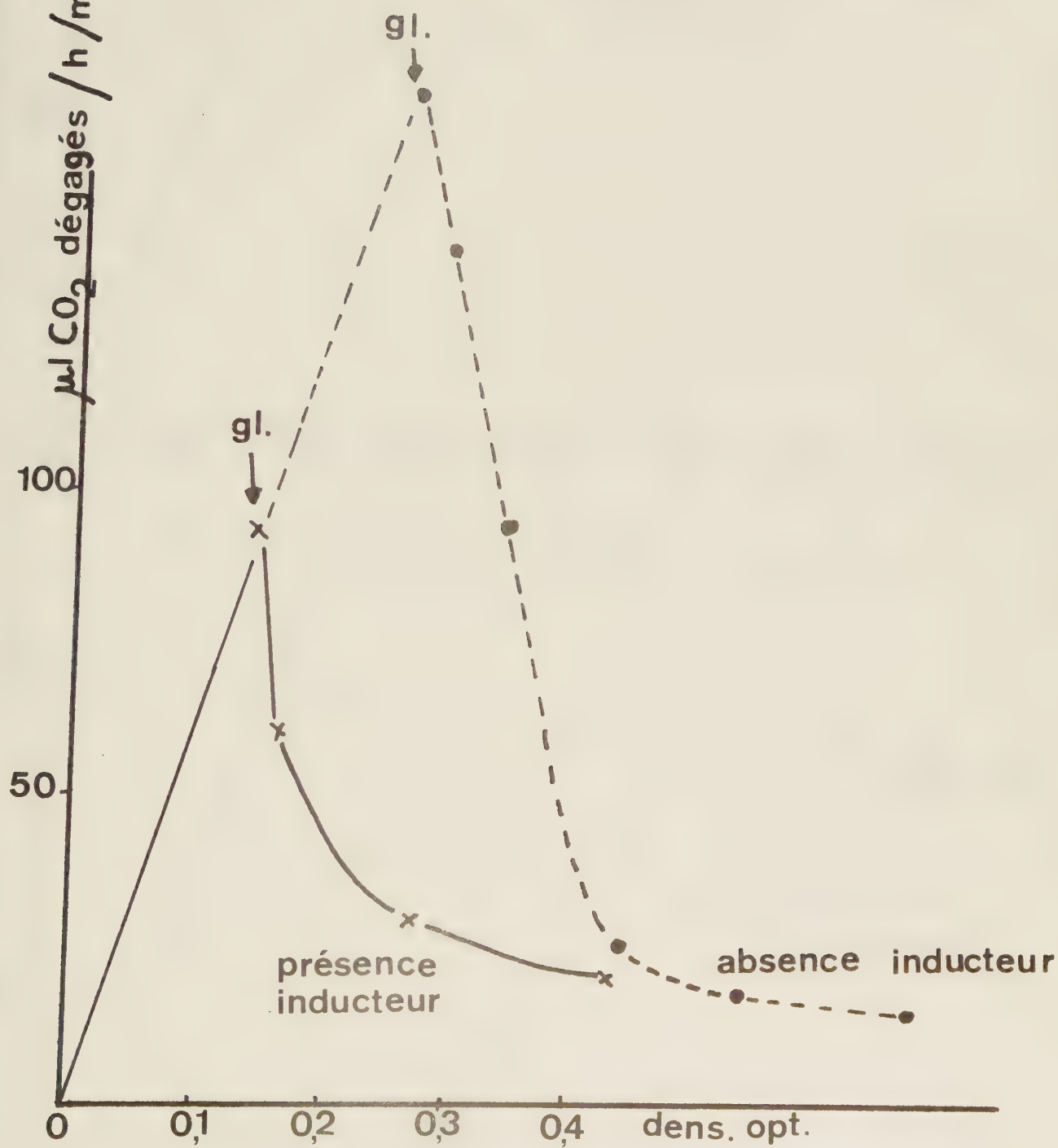
croissance sur maltose	0,360	3,65 à 5,7
4h30 après l'addit. glucose	0,520	8,4 à 9,3

Pour les levures perméabilisées par congélation- décongélation ou pour les extraits aux ultra-sons et par éclatement des protoplastes, l'addition de glucose réprime partiellement la synthèse de l'alphaglucosidase. Les valeurs de l'activité enzymatique sont plus élevées pour les extraits que pour les levures perméabilisées. Les résultats pour les levures perméabilisées à la nystatine sont très irréguliers.

4.2.2- Influence de la présence de l'inducteur sur la répression catabolique de la maltozymase.

Görts (1969) dans son étude sur l'inactivation

Figure 23 : Répression de la maltozymase en présence et en absence de l'inducteur - Levure 167.



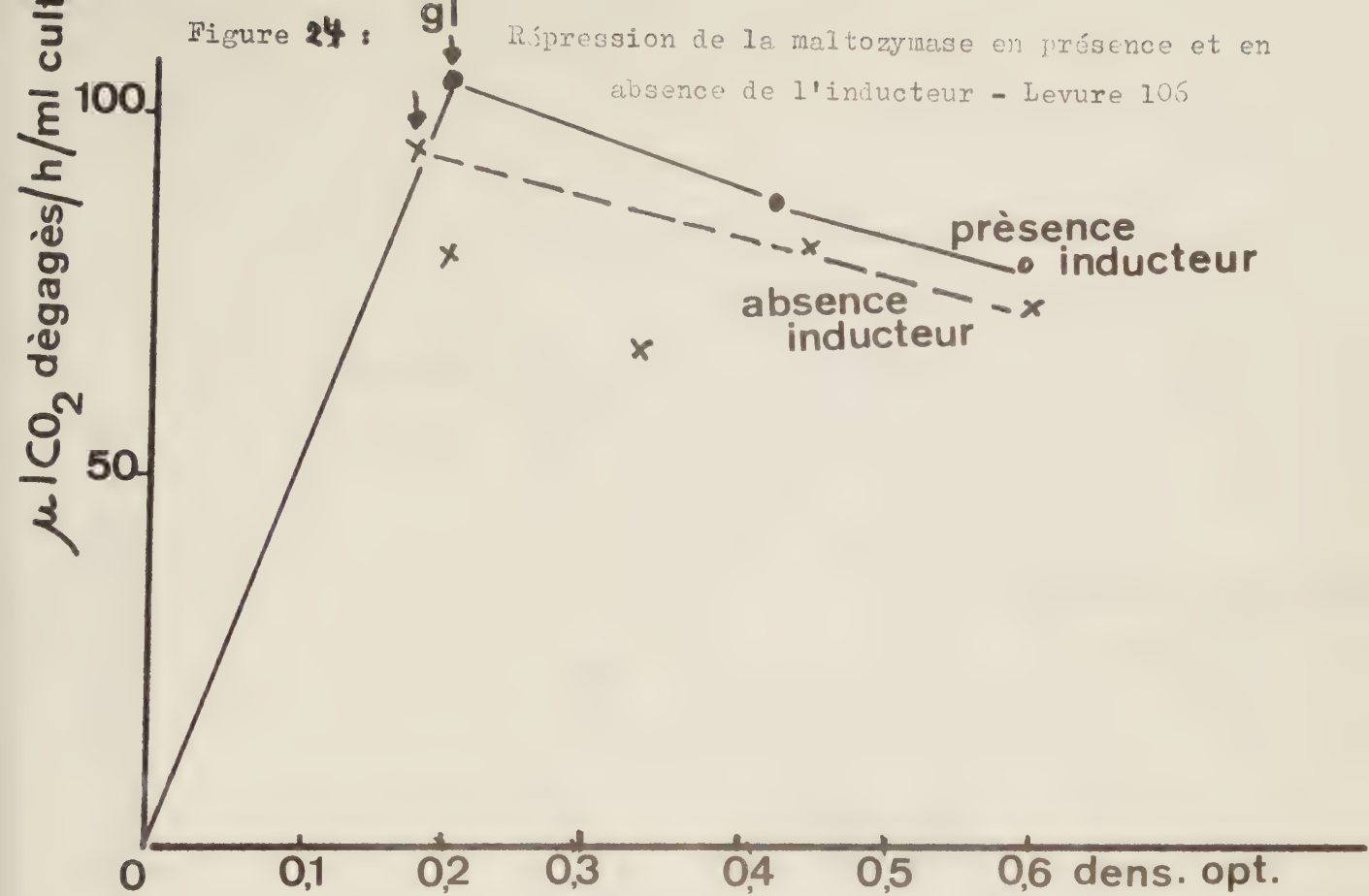


Figure 25 : Répression de la maltozymase en présence et en absence de l'inducteur - Levure 173

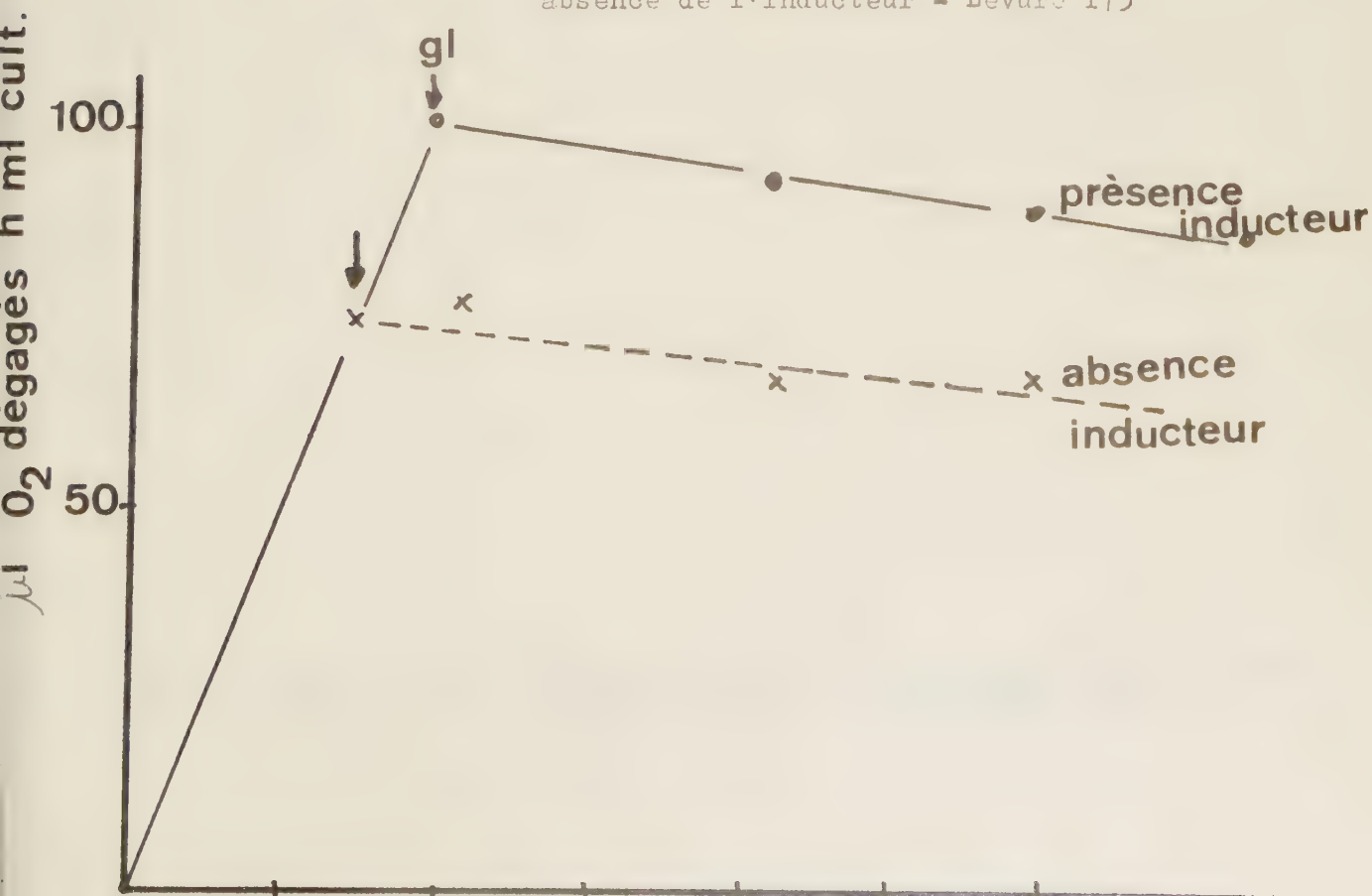


Figure 26 : Répression de l'alphaglucosidase en présence et en absence de l'inducteur - Levure 167

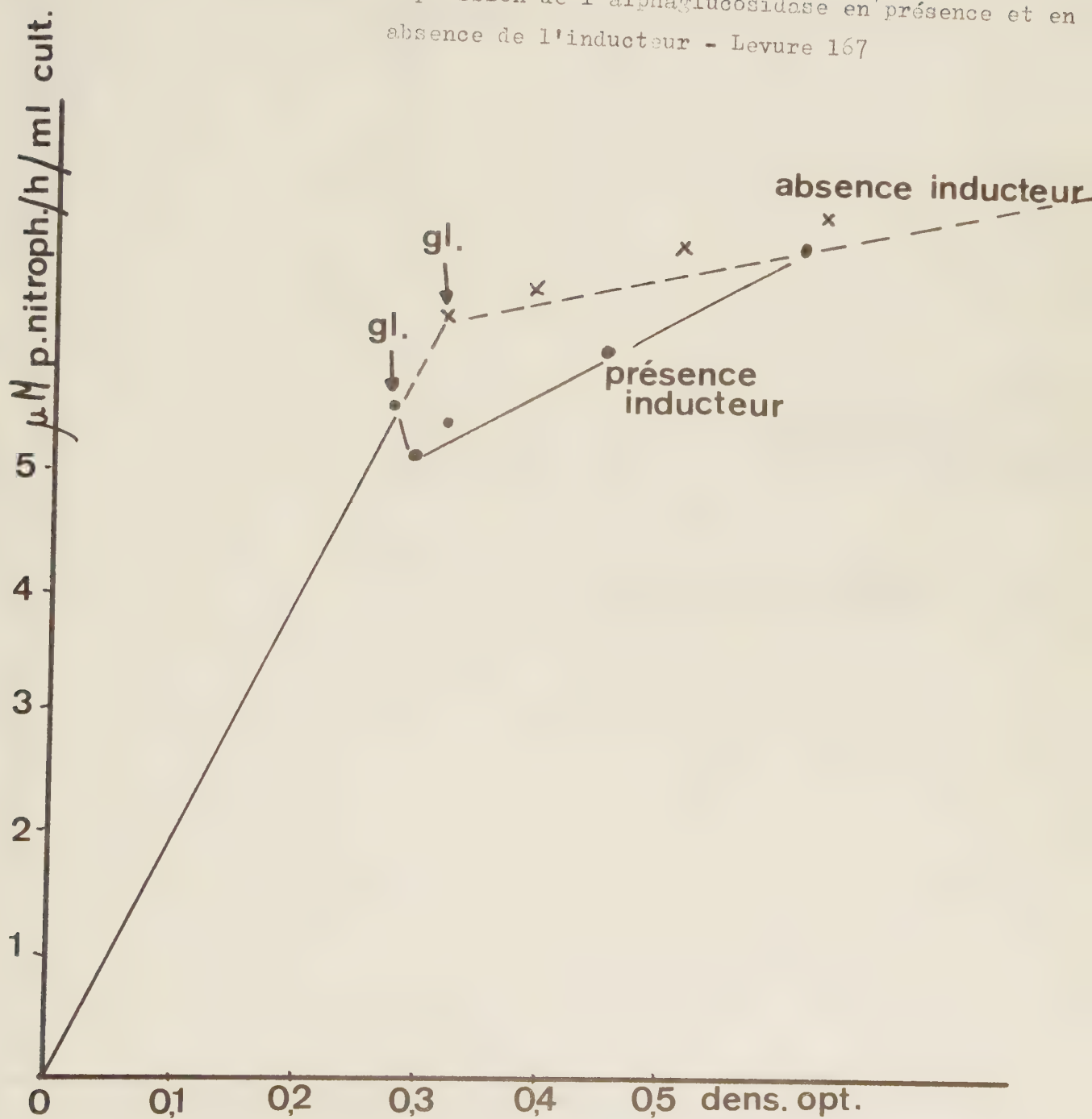


Figure 27 : Répression de l'alphaglucosidase en présence et en absence de l'inducteur - Levure 123

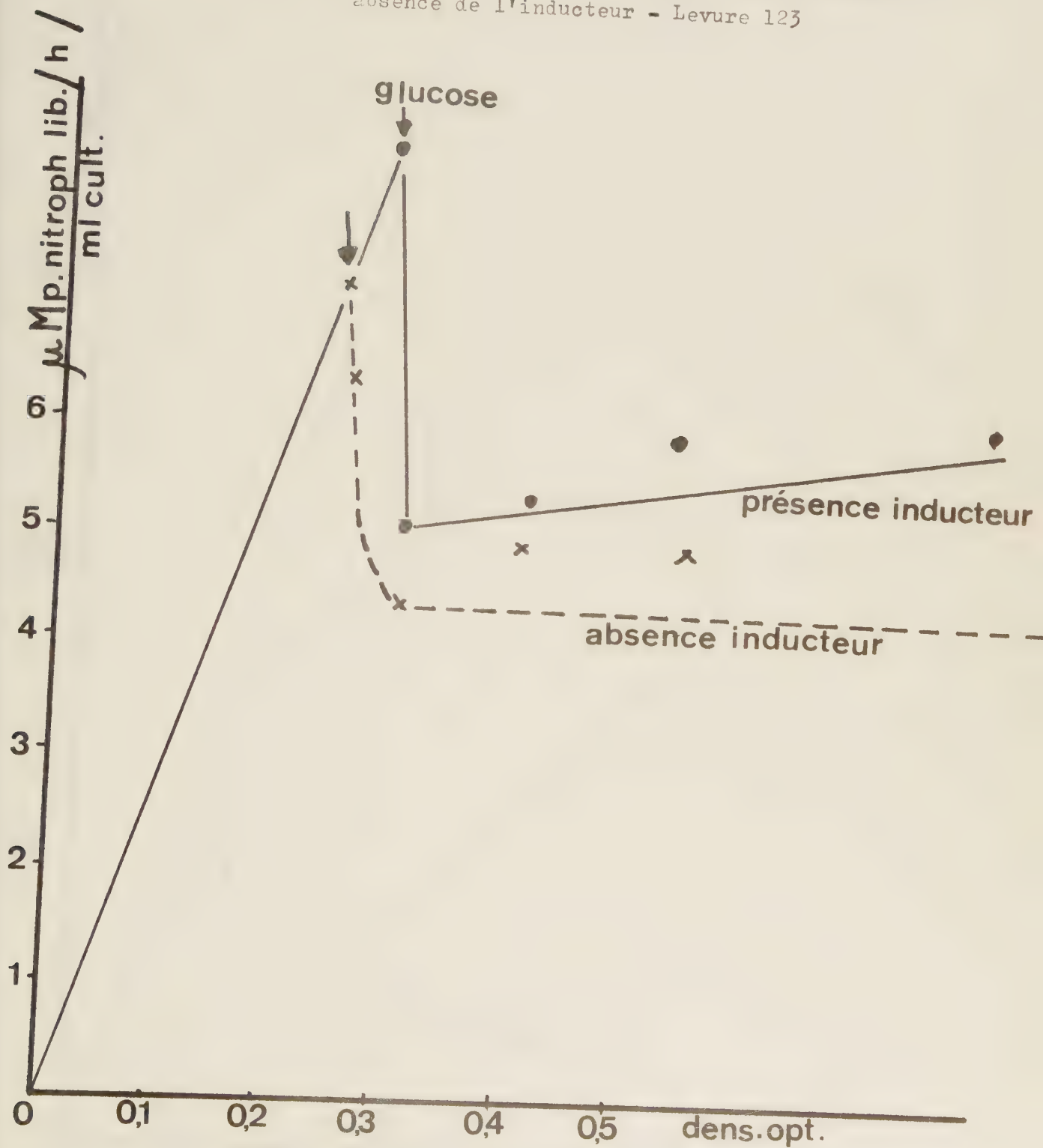


Figure 28 :

Influence du rapport $\frac{\text{Inducteur}}{\text{Répresseur}}$
sur la répression de la maltosynthase.

Levure 167

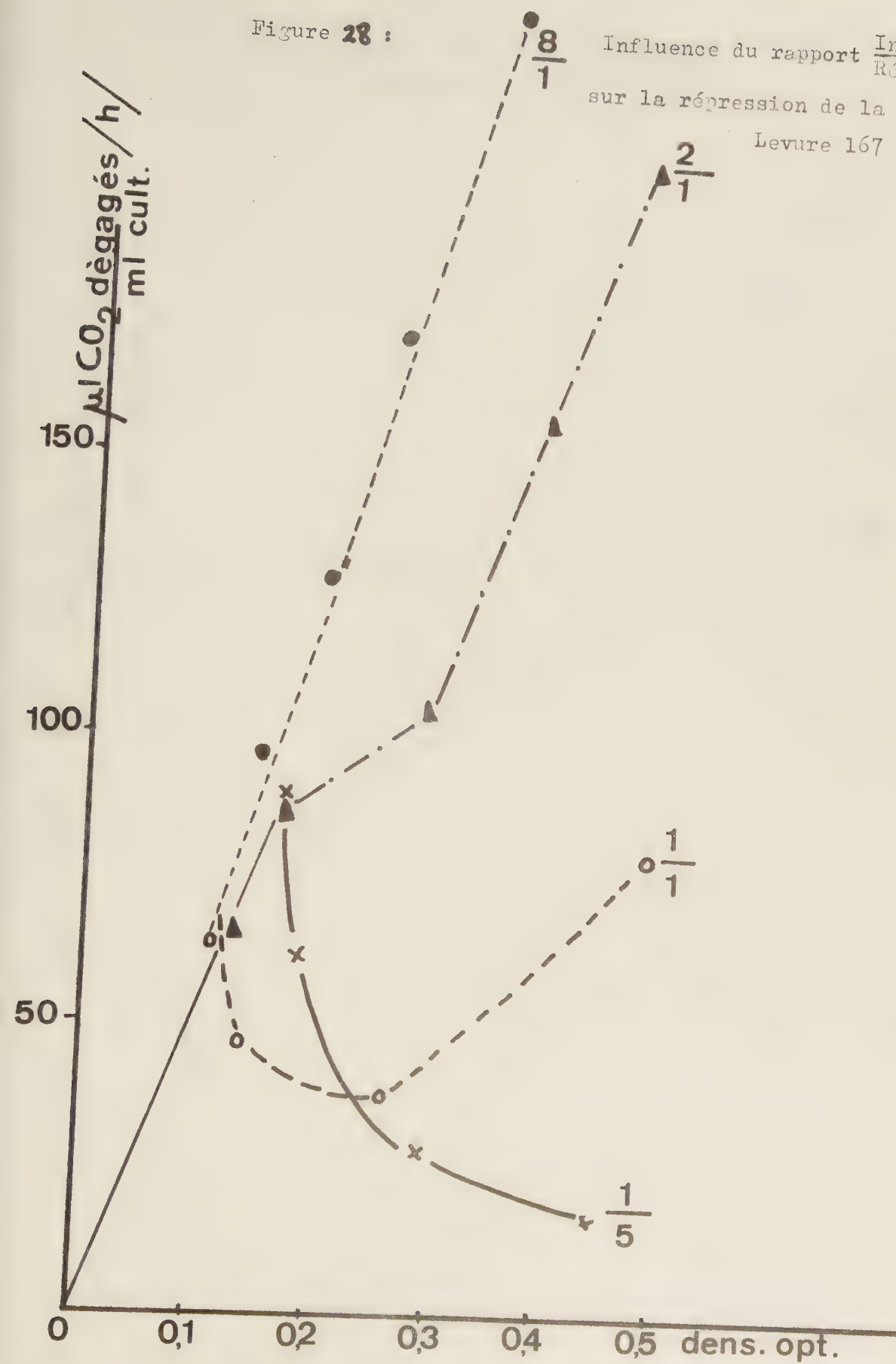
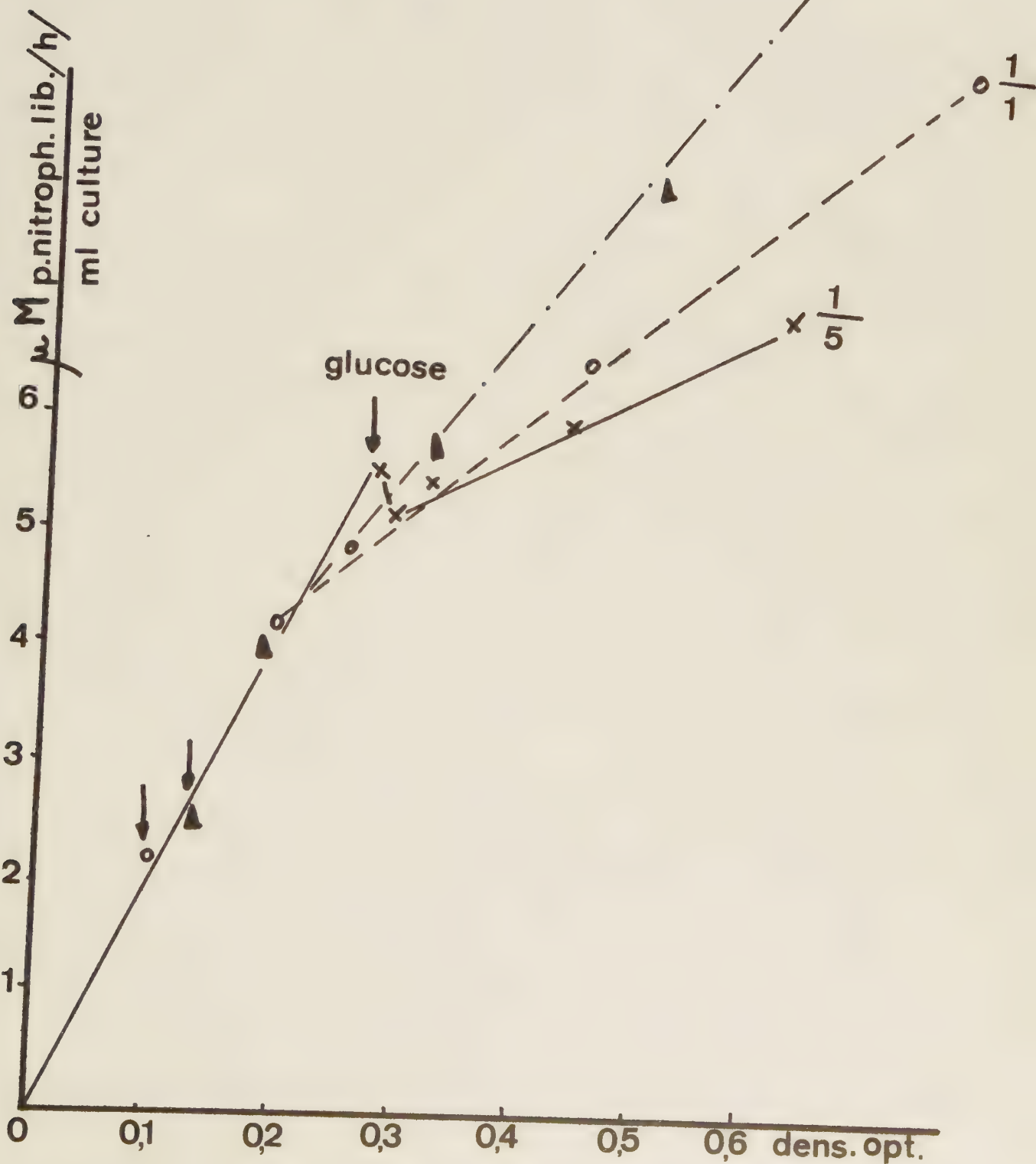


Figure 29 : Influence du rapport $\frac{\text{Inducteur}}{\text{Répresseur}}$ sur la répression de l'alphaglucosidase. Levure 167



de la perméase du maltose par le glucose signale que cette inactivation se produit même en présence de l'inducteur.

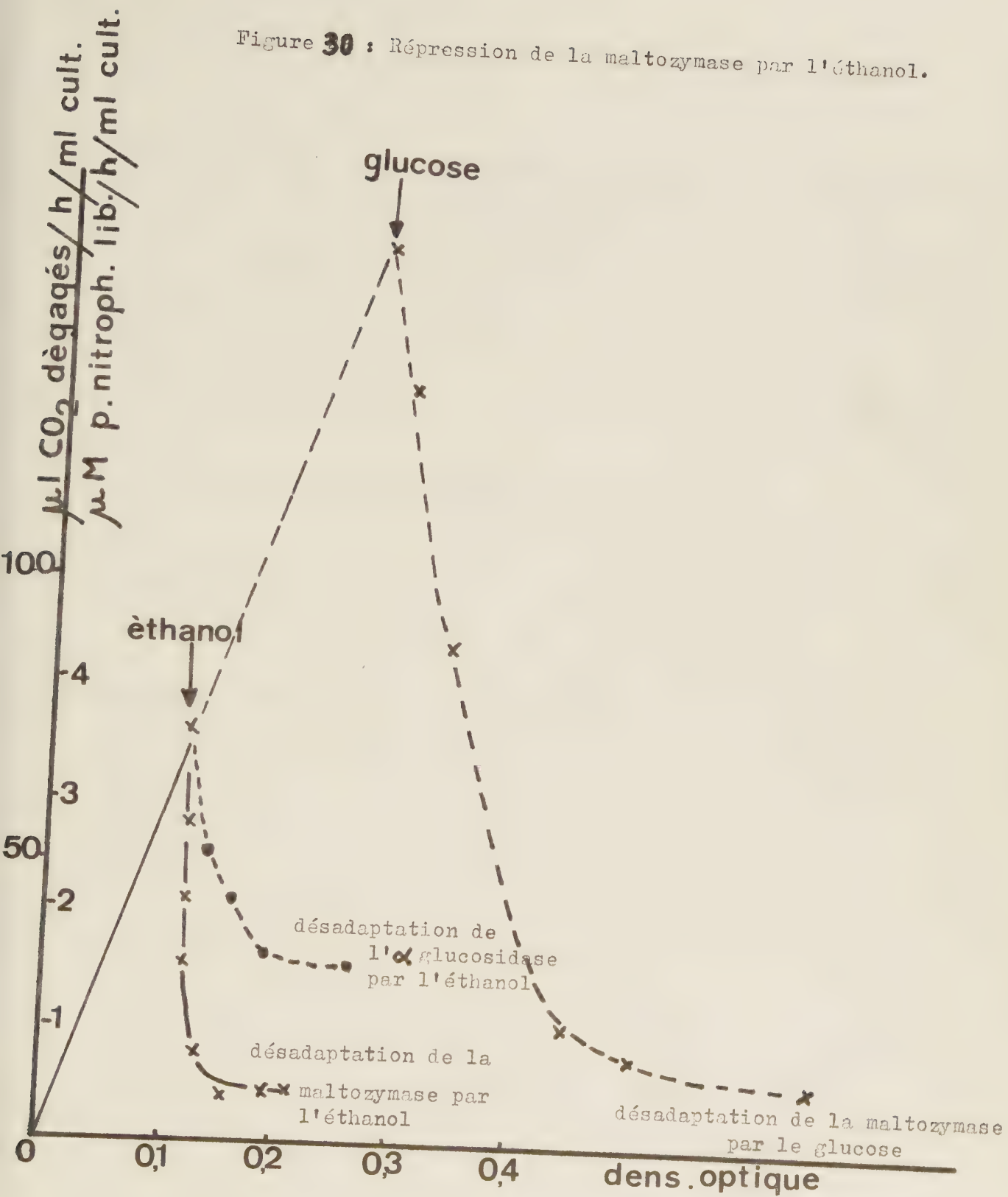
L'inactivation est de 34% si la levure est cultivée en présence de 2% de glucose et de 38% dans un mélange de 2% de glucose et 1% de maltose. La perméase n'est donc pas protégée suivant Görts par la présence de l'inducteur.

Des cultures avec les levures *S.carlb.* 167 et *cerev.* 106 et 173 ont été réalisées sur milieu n°1 2% maltose. Nous avons ajouté d'une part 10% de glucose à la culture, d'autre part la culture a été centrifugée stérilement et la levure réensemencée sur milieu n°1 contenant 10% de glucose. Les résultats sont représentés dans les figures 23, 24 et 25. La maltozymase est désadaptée en présence ou en absence de l'inducteur. Des résultats semblables sont obtenus pour l'alphaglucosidase, la répression de la synthèse de l'enzyme par le glucose a lieu en présence ou en absence du maltose. Pour les levures *S.cerev.* 106 et 123 et *S.carlb.* 167, le glucose ~~réprime la~~ ~~synthèse de~~ l'alphaglucosidase. Pour la levure *S.cerev.* L73, le glucose est sans effet sur la synthèse de l'enzyme. Les figures 26 et 27 montrent les résultats obtenus pour les levures 167 et 123.

4.2.3- Influence du rapport maltose / glucose sur la répression de la maltozymase.

Les expériences précédentes ont été réalisées avec un rapport inducteur / répresseur de 1/5. La concentration en répresseur est diminuée dans les expériences suivantes. La levure *S.carlb.* 167 est cultivée sur milieu n°1 contenant 2% de maltose. En phase exponentielle 0,25, 1, 2 et 10% de glucose sont ajoutés à la culture. Les résultats sont donnés dans les figures 28 et 29. Lorsque la concentration en répresseur diminue, la désadaptation de la maltozymase et de l'alphaglucosidase est de moins en moins marquée. Pour un rapport inducteur/ répresseur

Figure 30 : Répression de la maltosylase par l'éthanol.



de 2/1, le glucose est pratiquement sans effet sur la maltozymase. Lorsque par contre la concentration du répresseur catabolique est plus élevée que celle de l'inducteur, la maltose ne protège plus la perméase de la désadaptation, ni n'empêche une répression partielle de l'alphaglucosidase. Si l'affinité de la perméase du maltose pour le maltose diminue en présence de glucose comme l'indique Görts (1969), il est normal que la désadaptation de la maltozymase soit influencée par la concentration en répresseur utilisée.

4.2.4 - Répression de la maltozymase par l'éthanol.

Görts (1969) signale que seul le glucose est un répresseur de la maltozymase. Si le glucose est remplacé par l'éthanol, aucune répression ou désactivation de la maltozymase n'est observée par cet auteur chez *S.cerevisiae* Hansen.

La levure *S.carlb.* 167 est cultivée sur milieu n°1 contenant 2% de maltose. En phase exponentielle de croissance, la levure est centrifugée stérilement et ensemencée sur le milieu n°1 contenant de l'éthanol 2%. La levure *S.carlb.* 167 s'adapte difficilement à l'oxydation de l'éthanol, la latence est de 16 heures et le temps de génération de 16 heures sur ce substrat. Contrairement aux résultats de Görts (1969), la désadaptation de la maltozymase est très rapide pour la levure *S.carlb.* 167 en présence d'éthanol. Les résultats sont donnés dans le tableau n°17 et dans la figure 30.

Tableau n°17 - Répression de la maltozymase par l'éthanol.

D.O récolte	maltozymase microl CO2 dég./h/ml	alphaglucosidase μM p.nitroph./h/ ml
0,120	72	3,7
0,120	53	3,7
0,120	43	3,7
0,120	32	—

0,130	15	-
0,140	11	2,55
0,160	9	2,18
0,190	8,5	1,68
0,210	9,3	1,64

La maltozymase n'atteint plus que 15% de sa valeur initiale lorsque la croissance sur éthanol débute. La répression par l'éthanol est plus rapide que celle observée par le glucose. L'alphaglucosidase est désactivée par l'éthanol, alors qu'avec le glucose seule sa synthèse était partiellement réprimée.

4.2.5- Corrélation entre répression de la maltozymase et répression des enzymes respiratoires par le glucose.

Görts (1967) et Van Wijk (1968) montrent qu'il existe une corrélation entre répression et dérépression des enzymes de la respiration et de la maltozymase. Pour des concentrations en glucose inférieures à 0,1% ou en croissance sur galactose, les enzymes de la respiration et la maltozymase sont déréprimés. Dans de telles conditions de dérépression, l'activité de ces enzymes triple. Pendant la 2^e phase exponentielle de croissance sur glucose qui correspond à l'utilisation de l'éthanol, Görts (1967) montre le contenu de la levure en alphaglucosidase, en isocitrique déshydrogénase et en cytochrome a,b, c augmente dans les mêmes proportions. Lorsqu'on passe d'une croissance sur galactose à une croissance sur glucose, Van Wijk (1968) mesure une répression parallèle des enzymes respiratoires : succinique déshydrogénase, aconitase et isocitrique déshydrogénase et de l'alphaglucosidase. Van Wijk (1968) et Görts (1967) en concluent que ces systèmes enzymatiques tout deux réprimés par le glucose sont régulés par un mécanisme commun. Suivant Van Wijk (1968), le pool de catabolites inhibiteurs provenant de la glycolyse est

utilisé par la respiration et cette utilisation permet une dérépression de l'alpha-glucosidase.

Dans les résultats suivants, nous examinerons si, dans le cas des levures utilisées dans ce travail, le parallélisme entre synthèse des enzymes de la respiration et de la maltozymase se trouve également confirmé.

4.2.5.1- Evolution de la maltozymase au cours de la croissance sur glucose 0,15%.

Les expériences sont réalisées avec la levure *S.carlsb.* 167. En croissance sur glucose 0,15%, cette levure utilise le glucose par fermentation avec un temps de génération de deux heures, l'éthanol accumulé est ensuite oxydé après une diauxie de huit heures avec un temps de génération de dix heures. Si les observations de Görts se trouvaient vérifiées dans le cas de la levure *S.carlsb.* 167, nous devrions en principe nous attendre à une dérépression parallèle des enzymes respiratoires et de la maltozymase lors de la 2^e phase exponentielle de croissance. Nous savons en effet que dans ce cas, il y a synthèse des enzymes du shunt glyoxylique et de la succinique déshydrogénase (p.40) Il s'agissait donc de vérifier s'il en était également ainsi pour la maltozymase et l'alpha-glucosidase. Les résultats concernant l'évolution de ces deux enzymes sont exprimés dans le tableau n° 18.

Tableau n° 18 - Evolution de la maltozymase et de l'alpha-glucosidase au cours de la croissance sur glucose 0,15%-

Levure 167	maltozymase μl CO ₂ dég./h/mgp.sec	alpha-glucosidase μM p.Nitroph/h/ mgp.s extrait par congél.
départ gluc.10%	20	-
1 ^e phase exp.	100 à 200	3,7
diauxie	100 à 120	6
2 ^e phase exp.	85	6
fin 2 ^e phase exp.	55	4,7

La croissance sur maltose 2%, nous donnait les valeurs suivantes :
 maltozymase 400 microlitres CO₂ dégagés / heure / mg poids sec,
 alphaglucosidase 15 microlitres de p.nitronphénol libérées / heure
 / mg de poids sec. Pour une concentration en glucose de 0,15%,
 l'activité de la maltozymase augmente de 10 à 20 fois alors que pour
 des concentrations supérieures à 0,5%, on note une diminution de
 l'activité de ces enzymes. Les valeurs atteintes ne sont cependant
 pas aussi élevées que celles obtenues en croissance sur maltose 2%.
 Nous obtenons comme Görts (1967) et Van Wijk (1968) une dérèpres-
 sion de la maltozymase en présence de faibles concentrations en
 glucose. Cependant, nous n'observons pas de synthèse parallèle
 des enzymes respiratoires et de la maltozymase. En effet,
 1°/ le glucose 0,15% qui inhibe la respiration avec une activité
 négligeable de la succinique déshydrogénase et des enzymes du
 shunt glyoxylique entraîne par contre une dérèpression de la
 maltozymase qui atteint une activité maximum vers la fin de la
 première phase exponentielle de croissance. L'alphaglucosidase
 est synthétisée avec un certain retard pour atteindre au début
 de la deuxième phase une activité maximum.
 2°/ après épuisement du glucose et adaptation à l'oxydation
 de l'éthanol, la vitesse d'utilisation du maltose diminue rapi-
 dement avec des valeurs 3 à 4 fois moins élevées que celles
 obtenues avant la diauxie.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux
 de Görts (1967) et Van Wijk (1968). Une différence essentielle
 entre la levure 167 et les levures étudiées par ces auteurs
 consiste en la répression de la maltozymase chez la levure 167
 par l'éthanol, alors que chez ces auteurs, l'éthanol est sans
 effet (Görts) ou inducteur (Van Wijk^o. La diminution de la
 maltozymase chez la levure 167 pendant la 2^e phase exponentielle
 s'explique par l'effet répresseur de l'éthanol. L'éthanol

réprime d'abord la perméase du maltose puis l'alphaglucosidase.

L'évolution de la maltozymase pendant la croissance sur maltose 0,15% ou maltose 2% permet de confirmer la répression par l'éthanol. Dès l'amorce de la diauxie, nous observons une diminution de la maltozymase comme le montre le tableau n°19.

Tableau n°19 - Evolution de la maltozymase au cours de la croissance aérobie sur maltose 2%.

	maltozymase $\mu\text{l CO}_2 \text{ dég.}/\text{h}/\text{mg p.s.}$	alphaglucosidase $\mu\text{M p.nitroph. lib.}/\text{h}/\text{mg prot.}$
départ	205	30
1 ^e phase exp.	400	36
début diauxie	340	-
milieu diauxie	310	130
fin diauxie	285	148
2 ^e phase exp.	175	128
fin croissance	135	37

4.2.5.2- Evolution de la maltozymase en croissance sur acétate 0,7%.

Si l'évolution de la synthèse de la maltozymase et des enzymes de la respiration est parallèle, le passage d'une croissance sur glucose 2% (première phase exponentielle) à une croissance sur acétate 0,7% (substrat utilisé exclusivement par respiration) devrait conduire à une augmentation à la fois de la maltozymase et des enzymes de la respiration. La maltozymase est mesurée par le $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ maltose (microlitres de CO_2 dégagés / heure / mg poids sec), et le Q_{O_2} maltose (microlitres O_2 absorbés / heure / mg poids sec), la respiration par le Q_{O_2} glucose. Les résultats sont exprimés dans le tableau n° 20.

Tableau n° 20 - Evolution de la maltozymase en croissance sur acétate 0,7%. Levures S.carlsb. 167 et cerv. 123.

	croissance glucose 2%			croissance maltose 2%		
	$Q_{CO_2}^{N_2}$ malt.	QO ₂ malt.	QO ₂ gluc.	$Q_{CO_2}^{N_2}$ M	QO ₂ G	QO ₂ G
levure 123	75	77	46	45	60	110
levure 167	31	20	17	17	39	118

Nous avons choisi deux levures dont la maltozymase est désactivée par le glucose. La croissance sur acétate nous montre une adaptation à la respiration : le QO₂ augmente de 2,5 à 5 fois. la maltozymase elle reste inchangée : même $Q_{CO_2}^{N_2}$ maltose et QO₂ maltose en croissance sur acétate et sur glucose. A nouveau ici, nous n'observons pas de synthèse parallèle des enzymes respiratoires et de la maltozymase

4.2.5.3- Corrélation entre répression des enzymes respiratoires et de la maltozymase chez les différentes souches de levures étudiées.

Si une corrélation existe entre répression des et la maltozymase et des enzymes respiratoires, les différentes levures étudiées devraient avoir une régulation identique pour ces deux systèmes enzymatiques : elles devraient être constitutives, répressibles ou désactivées à la fois pour la maltozymase et pour les enzymes de la respiration. Dans le tableau 21, nous remarquons qu'un tel parallélisme ne se retrouve pas chez les levures étudiées.

Tableau n° 21 - Répression de la maltozymase et des enzymes respiratoires chez les différentes souches de levures.

levures	répression des enzymes respiratoires	répression de la maltozymase
S.cerev. 101	très faible-pas de diauxie	répression
123	très faible-pas de diauxie	désactivation
173	très faible-pas de diauxie	répression
106	très faible-pas de diauxie	répression
S.carlsb. 167	forte-diauxie 8 heures	désactivation
306	faible-1h30 diauxie	désactivation
311	faible- 2H diauxie	désactivation
337	forte- 13h30 diauxie	désactivation
338	forte - 7h diauxie	insensible au glucose
339	faible- 1h30 diauxie	désactivation
340	forte 4h diauxie	désactivation
350	forte- 7h diauxie	désactivation

Il ressort de ces résultats que le comportement physiologique des souches analysées en ce qui concerne la régulation métabolique de la maltozymase et des enzymes respiratoires est extrêmement hétérogène. Pour les *S.cerevisiae* 101, 106, 123 et 173, la répression catabolique par le glucose des enzymes respiratoires est très faible. La capacité respiratoire reste élevée tout au long de la croissance sur glucose 0,15% et aucun phénomène de diauxie n'est observé dans ces conditions. Pour ces mêmes levures, la sensibilité de la maltozymase au glucose se présente d'une manière très différente. La synthèse est arrêtée pour les souches 101, 106 et 173, alors que l'enzyme préformée est désactivée dans le cas de la souche 123.

Les *S.carlsbergensis* 167, 306, 311, 337, 338, 339, 340 et 350 se caractérisent tous par un Contr'Effet Pasteur très marqué.

L'apparition d'une diauxie en croissance sur des concentrations limitantes en glucose apparaît donc comme une caractéristique générale de ces souches. Il en est de même pour la maltozymase dont la perméase du maltose est rapidement désactivée en présence de glucose.

Un tel parallélisme ne pourrait toutefois être généralisé. La levure 338 est en effet insensible au glucose en ce qui concerne l'activité de la maltozymase, alors que la synthèse des enzymes respiratoires se trouve considérablement inhibée dans ces mêmes conditions. Si une corrélation entre la synthèse des enzymes respiratoires et de la maltozymase ne pourrait être exclue à priori, il nous semble toutefois précaire de vouloir interpréter les mécanismes impliqués dans la répression et la dérépression catabolique sur cette seule base. L'absence totale de corrélation se remarque plus particulièrement pour les levures 123 et 338. Le comportement de ces deux levures montre que la maltozymase et les enzymes respiratoires présentent des sensibilités essentiellement différentes à un répresseur catabolique commun et que cette sensibilité s'exprime par ailleurs d'une manière totalement indépendante pour ces deux systèmes enzymatiques. Pour la levure 123, le glucose est sans effet sur la synthèse des enzymes respiratoires mais a par contre une désactivation très rapide de la maltozymase pour conséquence. Cette même opposition se trouve vérifiée pour la levure 338, mais dans ce cas la situation est inversée quant aux enzymes touchés par la répression catabolique.

4.2.6 - Conclusions et discussion de la deuxième partie

Deruis les travaux de Robertson et Halvorson (1957),

de Van wijk (1968) et de Görts (1969), nous savons que le glucose réprime la maltozymase : le glucose inhibe la perméase du maltose (arrêt de la synthèse et inactivation de l'enzyme existant) et réprime partiellement ou complètement la synthèse de l'alphaglucosidase. Cet effet du glucose dépend de la concentration utilisée, en dessous de 0,1%, le glucose dérprime la maltozymase, alors qu'il est répresseur à des concentrations plus élevées que 0,2% (Halvorson 1957- Sutton et al 1962- Van Wijk 1968- De Kroon et al 1970). Cette sensibilité de la maltozymase au glucose varie avec la souche de levure envisagée (Harris et Millin 1963). Le glucose exerçant également une répression sur les enzymes de la respiration, Görts (1967) et Van Wijk (1969) observent un parallélisme entre répression et dérpression des enzymes de la respiration et de la maltozymase.

Il ressort de nos résultats que le taux de répression catabolique de la perméase du maltose et de l'alphaglucosidase varie considérablement d'une souche à une autre. De telles variations ont également été observées pour les enzymes respiratoires. Pour la perméase du maltose, trois cas peuvent se présenter :

1/ La perméase du maltose est insensible à la présence de glucose: levure *S.carlsb.* 338.

2/ La synthèse de la perméase du maltose est réprimée (arrêt de la synthèse) par le glucose : levures *S.cerev.* 101, 106 et 173.

3/ La perméase du maltose est inhibée (arrêt de la synthèse et désactivation de l'enzyme existant) : levures *S.cerev.* 123 et la plupart des *S.carlsb.* 167, 337, 339, 340, 306, 311 et 350.

Pour l'alphaglucosidase, deux cas peuvent se présenter :

1/ La synthèse de l'alphaglucosidase est partiellement ou complètement réprimée par le glucose : levures *S.carlsb.* 167 et 306, levures *S.cerev.* 106 et 123.

2/ Le glucose est sans effet sur l'alphaglucosidase : levure S.cerev. 173.

La perméase du maltose est donc plus sensible que l'alphaglucosidase à l'action du glucose. Chez la levure 173, la perméase du maltose est réprimée alors que l'alphaglucosidase est insensible au glucose. Pour les levures S.carlsb. 167 et 306 et S.cerev. 123, la perméase du maltose est inhibée et la synthèse de l'alphaglucosidase est réprimée par le glucose.

Cette désadaptation de la maltozymase ne fait pas intervenir la synthèse d'une protéine inhibitrice comme dans le cas décrit par Béchet (1965) pour la régulation de l'ornithine transcarbamylase par l'arginine. En effet, l'addition d'actidione est sans action. Görts, par contre avec S. cerev. Hansen a trouvé une inactivation deux fois plus lente de la maltozymase en présence d'actidione. Il en conclut à la participation d'une protéine inhibitrice.

L'éthanol contrairement aux résultats de Görts (1969) est pour la levure S.carlsb. 167 un répresseur plus puissant de la maltozymase que ne l'est le glucose. En effet, en présence d'éthanol, la perméase du maltose et l'alphaglucosidase sont inhibées.

Le rapport de la concentration en inducteur / concentration en répresseur influence également la répression de la maltozymase. Lorsque la concentration en répresseur diminue par rapport à celle de l'inducteur, la désadaptation est de moins en moins marquée. Pour un rapport ^{maltose} ~~glucose~~ / ^{glucose} ~~maltose~~ 2/1 le glucose est pratiquement sans effet.

Le glucose ayant un effet répresseur à la fois sur les enzymes de la respiration et sur la maltozymase, une même régulation pourrait intervenir pour ces deux systèmes enzymatiques. C'est ce qu'ont montré Van Wijk (1968) et Görts

(1967). Une telle corrélation ne pourrait être généralisée et ce pour les raisons suivantes :

1°/ au cours de la croissance sur glucose 0,15%, le glucose réprime la synthèse des enzymes respiratoires et déréprime la maltozymase. La croissance sur éthanol pendant la deuxième phase exponentielle, induit la synthèse des enzymes de la respiration et réprime la maltozymase.

2°/ le passage d'un milieu glucose à un milieu contenant de l'acétate (substrat utilisé par respiration) induit la synthèse des enzymes de la respiration et est sans effet sur la maltozymase.

3°/ la régulation des enzymes respiratoires d'une part et de la maltozymase d'autre part est différente chez les levures étudiées. En effet, la répression des enzymes respiratoires est très faible chez les levures *S.cerev.* 101, 106, 123 et 173, faible chez les levures *S.carlb.* 306, 311 et 339, forte chez les levures *S.carlb.* 167, 337, 338, 340 et 350.

Pour la maltozymase, le glucose est sans effet pour la levure *S.carlb.* 338, la synthèse de la maltozymase est arrêtée par le glucose chez les levures *S.cerev.* 101, 106 et 173. Le glucose arrête la synthèse et inhibe une partie de l'activité de l'enzyme préformée chez *S.cerev.* 123 et *S.carlb.* 167, 306, 311, 337, 339, 340 et 350.

4.3 - CHAPITRE 3 - ESSAI DE DEPLOIDISATION DES LEVURES INDUSTRIELLES.

L'isolement de levures de ploïdie connue à partir de levures industrielles présente un intérêt certain. En effet, les levures sélectionnées pour leurs propriétés industrielles sont des organismes complexes, d'origines diverses, souvent polyploïdes, peu connus du point de vue enzymatique et génétique. Dans les laboratoires de génétique par contre les chercheurs travaillent avec un petit nombre de levures sélectionnées pour leurs propriétés génétiques. Il nous a paru intéressant d'appliquer aux levures industrielles les techniques mises au point dans ces laboratoires. Nous essayerons notamment d'isoler à partir des levures industrielles des levures haploïdes.

Ces levures haploïdes pourraient être utilisées pour l'étude de nombreux problèmes intéressant l'industrie :

1°/ amélioration de souches existantes par hybridation.

Les hybrides suivants présenteraient un intérêt pour l'industrie :

hybride entre une levure floculente et une levure poussiéreuse, hybride entre une levure très aromatique et une levure neutre au point de vue goût et arôme, hybride entre une levure haute *S. cerevisiae* et une levure basse *S. carlsbergensis* et étude de la répression catabolique des enzymes de la respiration et de la maltozymase chez cet hybride.

2°/ contrôle de la production des alcools, esters, cétones et produits soufrés volatils par la sélection de mutants appropriés.

Un gène muté étant le plus souvent récessif, il faudrait pour voir apparaître le phénotype dans une cellule diploïde que les gènes allèles soient tous deux mutés. Les cellules industrielles sont polyploïdes et la probabilité de voir tous les gènes allèles

mutés est très faible. C'est pour cette raison que des levures haploïdes sont utilisées pour la fabrication de mutants.

Des souches de levures ne métabolisant plus certains produits défavorables au goût et à l'arôme de la bière et des autres boissons fermentées pourraient être sélectionnées par l'obtention de mutants : par exemple un mutant ayant besoin de valine , isoleucine et leucine pour sa croissance et dont la mutation se situerait au niveau de l'alpha acétolactate synthétase ne produirait plus ni diacétyl, ni 2-3 pentanedione. D'autre part, les substances favorables au goût et à l'arôme des boissons fermentées comme les alcools et les esters pourraient aussi être contrôlées par l'emploi de mutants. En effet, la synthèse des alcools et esters correspondants se fait à partir de précurseurs appartenant au chemin biosynthétique des amino-acides. Sur le chemin de la valine, isoleucine, leucine outre le diacétyl et le 2-3 pentanedione, nous trouvons l'alcool isobutylique, la propionaldéhyde, l'alcool propylique; l'alcool amylique normal, la méthylbutyraldéhyde, l'isovaléraldéhyde, l'isobutyraldéhyde et l'alcool amylique.

3°/ élucidation de chemins métaboliques empruntés par les levures. industrielles et des régulations du métabolisme des hydrates de carbone

Nous pensons ici à l'étude de la biosynthèse des alcools supérieurs, aldéhydes, cétones et esters. Des problèmes relatifs au métabolisme oxydatif et fermentaire des hydrates de carbone comme ceux exposés aux chapitres 1 et 2 de ce travail pourraient également être étudiés à l'aide de mutants. Par exemple, Beckwith et al (1970) ont pu montrer chez E.Coli que la répression catabolique se fait au niveau du promoteur. En effet, un mutant portant une délétion dans la zone du promoteur est insensible

à la répression catabolique. Foury et Goffeau (1972) sont parvenus à isoler des mutants de la levure schizosaccharomycès pombe, dont la réponse à la répression catabolique des enzymes de la respiration est modifiée. Un des mutants est insensible au glucose, chez l'autre les enzymes respiratoires sont plus fortement réprimés par le glucose qu'elles ne le sont chez la levure sauvage.

4.3.1- Taux de sporulation des levures de notre collection

Le test de sporulation sur milieu de Fowell a été réalisé avec 56 souches de levures hautes *S.cerevisiae* et 27 souches de levures basses *S.carlsbergensis*.

Levures hautes

Tableau n° 22 : Taux de sporulation des levures hautes

levures donnant des asques à 2 ou 3 ascospores		levures donnant des asques à 4 ascospores	
N°		4 ascospores en en losage	4 ascospores alignés ou en los.
106		101	104
108		115	
109		123	
113		169	
127		180	248
175		185	
249		192	
286			
8 levures		200 8 levures	2 levures

Levures présentant une sporulation très déficiente.

% très faible de figures de sporulation pas de figure de sporulation

151	117	174	241
160	120	179	244
173	121	181	251
178	122	186	256
184	129	193	257
187	135	194	258
207	136	212	266
284	140	213	277
	159	221	278
	160	239	236

8 levures

30 levures

Parmi les levures industrielles de fermentation haute, seules deux souches ont 4 ascospores alignés et 10 des asques à 4 ascospores. Ces 10 souches soit 21% pourraient servir à une étude génétique. Les 79% restantes sont de très mauvaises sporulantes.

Levures basses

A deux exceptions près, les levures de fermentation basse *S. carlsbergensis* ne sporulent pas.

Tableau n° 23 - Sporulation des levures basses - *S. carlsb.*

Souches de levures ne présentant aucune figure de sporulation

107 - 112 - 126 - 131 - 138 - 139 - 149 - 155 - 163 - 167 -
 176 - 190 - 211 - 214 - 216 - 218 - 222 - 230 - 236 - 240 -
 243 - 264 - 265 - 271 - 25 souches

Exceptions

237 : 50% d'asques à 2 ou 3 ascospores, quelques 4 spores en losange. Cette souche quoique provenant d'une brasserie de fermentation basse pourrait être une levure sauvage. Après fermentation sur moût, l'arôme produit se rapproche d'avantage de celui d'une bière de fermentation haute.

246 : 50% d'asques à 2 spores, parfois un asque à 3 spores, pas d'asques à 4 spores.

En vue d'améliorer le taux de sporulation des levures basses, des essais d'adaptation préalable à la respiration de l'acétate ont été effectués. Croes (1967) a en effet montré que les levures pour avoir un taux de sporulation convenable doivent être adaptées à la respiration. D'après les travaux d'Haboucha et al (1959) et les expériences décrites dans le chapitre 1, nous savons que la levure en présence de 2% de glucose, comme c'est le cas dans le milieu de présporulation, utilise le sucre par glycolyse et ne s'adapte pas à la respiration de l'éthanol accumulé que lorsque le sucre est complètement fermenté. L'emploi d'une quantité moindre de sucre favorisera l'adaptation à la respiration. Nous avons donc utilisé un milieu de présporulation contenant 0,15% de glucose et 0,1% de yeast extract. Malheureusement, le taux de sporulation ne s'est pas amélioré par ce procédé.

4.3.2 - Dissection des asques à 4 spores des levures 101 et 180 à l'aide de la micromanipulation- Étude des ségrégeants.

Levure 101

63 ascospores provenant de 14 asques ont été isolés. Le taux de germination s'est cependant avéré extrêmement faible car seules 5 spores se sont développées. L'enrichissement du milieu de germination à l'aide de peptone et la suppression des enzymes "d'helix pomatia", n'ont pas permis d'améliorer le taux de germination. Les cinq ségrégeants qui se sont développés présentaient tous des caractéristiques d'aneuploïdie, c'est-à-dire :

1/ formes anormales en branches ou en ballons

2/ croissance très lente comparée à des levures haploïdes.

3/ impossibilité de déterminer le signe par suite des formes anormales dont certaines rappellent la figure caractéristique du zygote.

Un des ségrégeants a été cultivé sur moût et a donné une bière normale au point de vue atténuation, goût, arôme. La levure 101 est une levure floculente. Chez le ségrégeant, l'intensité de floculation est considérablement augmentée.

Levure 180

La micromanipulation d'asques de la levure 180 ne nous a pas permis d'isoler des ségrégeants. Sur les 20 ascospores isolés, aucun ne s'est développé.

Toutes ces difficultés nous ont fait abandonner la micromanipulation comme technique d'isolement de ségrégeants pour nous orienter vers l'isolement en masse (Emeis 1958). Cette technique nous permettra d'isoler rapidement une grande quantité d'ascospores viables.

4.3.3 - Isolement en masse des ségrégeants.

Levure 101

Après isolement par la technique d'Emeis (voir p.33) , les ascospores sont analysés quant à

1°/ leur sporulation : une présence d'asques est l'indice soit d'une contamination par la levure de départ, soit d'une présence de spores diploïdes aux .

2°/ leur signe : en recherchant les figures de zygote après mélange et incubation avec une levure haploïde de signe connu. 90 colonies ont été isolées, parmi celles-ci un seul ségrégeant resporule, la contamination par la levure 101 est donc à peu près nulle.

Parmi les 89 ségrégeants, nous avons trois groupes :

42 ségrégeants ont des formes analogues à celles observées avec les ascospores isolés par micromanipulation.

Parmi les 56 ségrégeants analysés, nous avons 41 ségrégeants (73%) pour lesquels la détermination du signe s'est avérée impossible.: absence de figure de zygote même après 30 heures d'incubation. Pour les 15 ségrégeants possédant un signe, 4 conjuguent avec la " yeast foam haploïde " a et sont donc de signe λ ; trois conjuguent avec la " yeast foam" α et sont donc de signe a . Huit autres ségrégeants ne conjuguent pas avec les levures haploïdes a ou α " yeast foam, mais bien pour cinq d'entr'elles avec le ségrégeant 101-2 présumé α et sont donc du signe a . Trois conjuguent avec le ségrégeant 101-12 présumé a et sont donc du signe α . Cette absence de conjugaison avec les levures haploïdes " yeast foam": levures génétiquement définies, mais peut-être très différentes des levures de brasserie, pourrait être due à une composition différente de la paroi cellulaire.

Lors d'un deuxième isolement, n'ont été retenus que les ségrégeants possédant un signe avec les levures haploïdes " yeast foam" a ou α . Nous avons ainsi isolés 43 ségrégeants marqués 101-71 à 101-113.

Tableau n° 25 : Détermination du signe des ségrégeants de la levure 101.

zygote avec yeast f. a		zygote avec yeast foam α		
101-71	101-72	101-73	101-74	101-76
101-75	101-78	101-77	101-79	101-80
101-82	101-87	101-81	101-83	101-84
101-94	101-98	101-85	101-86	101-88
101-101	101-108	101-89	101-90	101-91
101-109	101-112	101-92	101-93	101-95
12 ségrégeants de signe λ		101-96	101-97	101-99
		101-100	101-102	101-103
		101-104	101-105	101-106
		101-107	101-110	101-111
		101-113	31 ségrégeants de signe a	

Nous avons presque trois fois plus de ségrégeants viables de signe a que de ségrégeants de signe α . La levure 101 serait donc suivant les travaux d'Emeis (1958) de formule aa α . Cependant le grand nombre d'ascospores non viables nous permet de dire que cette levure ne possède pas un jeu complet de chromosomes : ici pour une triploïde 48 chromosomes.

Levure 192

141 ségrégeants viables ont été isolés. Parmi ceux-ci : 23 resporulent, 86 ne sporulent pas, mais ont des formes anormales, 32 ne sporulent pas et n'ont pas de formes anormales : nous les avons marqués 192-1 à 192-32.

Tableau n°26 : Détermination du signe des ségrégeants de la levure 192

zygote avec yeast f. a	zygote avec yeast f. α	zygote avec 192-19 α	zygote avec 192-23 a
192-19 signe α	192-23 signe a	192-3 192-14 192-20 signe a	aucun ségr.

ne forment pas de zygote

192-1	192-2	192-4	192-5	192-6	192-7	192-8	192-9
192-10	192-12	192-13	192-15	192-16	192-17	192-18	192-21
192-22	192-24	192-25	192-26	192-27	192-28	192-29	192-30
192-31	192-32						

Parmi les 32 ségrégeants testés, 27 n'ont pas de signe , un forme des zygotes avec la yeast foam a et est donc de signe α . Quatre sont de signe a : un forme des zygotes avec la yeast foam α et trois avec 192-19 qui est de signe α . Pour cette

levure, l'absence de signe des ascospores est encore plus marquante que pour la levure 101. Seuls cinq ascospores ont un signe sur les 141 isolés et pour trois d'entr'eux, les figures de zygote sont peu nombreuses.

Levure 208

176 ségrégeants ont été isolés, 6 resporulent. Parmi ceux-ci, un ségrégeant de signe a resporule et forme des figures de zygotes avec la yeast foam α . Les 176 ségrégeants ont été testés au point de vue signe avec les levures haploïde a et α . 22 ségrégeants ont donné des figures de zygote, la plupart après 6 heures d'incubation avec la levure haploïde de signe connu. 20 ségrégeants sont de signe α et deux de signe a.

Levure 185

129 ségrégeants ont été isolés. Le taux de resporulation est très élevé : 109 ségrégeants resporulent. Les 20 ségrégeants non sporulants ont été testés du point de vue signe, aucun ne donnait de figure de zygote avec la levure "tester" a ou α .

En conclusion, nous avons sélectionné deux souches de levure 101 et 208 qui permettent d'obtenir des ségrégeants avec un signe. Ces deux levures sont couramment utilisées en fermentation haute. Comme les ségrégeants possèdent un signe, nous en avons fait une analyse génétique pour savoir s'il s'agit de levures haploïdes. Il faut cependant noter ici que beaucoup de ces ségrégeants ont la taille d'une levure diploïde, une croissance très lente et parfois des formes anormales. Toutes ces caractéristiques font plutôt penser qu'il s'agit de levures aneuploïdes.

4. 3.4- Analyse génétique des ségrégeants possédant un signe.

Le ségrégeant à étudier est mélangé en phase exponentielle de croissance avec une levure haploïde de signe connu. Dès que les figures de zygotes apparaissent, ceux-ci sont

isolés au moyen de la micromanipulation. La levure, formée à partir du zygote et supposée diploïde est mise en sporulation sur milieu à l'acétate. Une première difficulté rencontrée dans l'analyse génétique des ségrégeants est le mauvais taux de germination et de sporulation des zygotes isolés.

Ségrégeants de la levure 101.

101-2 x yeast foam a : bonne viabilité - bonne sporulation -
asques à 4 spores - dissection de trois
tétrades - aucun ascospore viable.

101-50 x yeast foam a : bonne viabilité - bonne sporulation -
dissection : 4 ascospores viables par
tétrades.

101-47 x yeast foam a : bonne viabilité- aucun zygote isolé ne
resporule.

101-12 x 101-2 : résultat irrégulier - pas de sporulation du zygote.

101-74 x yeast foam α : bonne viabilité - bonne sporulation-
dissection de 5 asques : un seul asco-
spore viable.

101-78 x yeast foam a : bonne viabilité - mauvaise sporulation
pas d'asques à 4 spores.

101-84 x yeast foam α : bonne viabilité des zygotes. Bonne sporul.
asques à deux spores.

101-106 x yeast foam α : bonne viabilité - bonne sporulation-
mauvaise viabilité des ascospores.

Les autres combinaisons essayées produisent soit des zygotes non viables, soit donnent des zygotes viables mais une sporulation du zygote insuffisante ou nulle. La combinaison 101-50 x yeast foam a donne des tétrades à ascospores viables, nous en ferons donc l'analyse.

Analyse génétique de l'hybride 101-50 x yeast foam a.

Figure 31 : Analyse génétique de l'hybride 101-50 x YF a

zygote 1

a	a	α
•	α	•
$\alpha(sp)$	•	α
•	$\alpha(sp)$	a

zygote 2

•(sp)	•	•	•(sp)	•	•	•
•(sp)	•(sp)	•	•(sp)	α	•(sp)	•
•	•(sp)	•(sp)	•(sp)	α	•(sp)	•(sp)
a(sp)	•(sp)	•	•(sp)	•	•	

• ascospore viable

a ou α ascospore viable de signe a ou α

•(sp) ascospore resporulant

$\alpha(sp)$ ascospore viable resporulant de signe α

Si la 101-50 est une levure haploïde, l'hybride 101-50 x YF a doit nous donner :

- 1/ 4 ascospores viables par tétrades.
- 2/ parmi ces 4 ascospores, 2 de signe a et de signe α .
- 3/ aucun ascospore sporulant.

En réalité, l'analyse de dix de ces tétrades à partir de deux zygotes nous montre une ségrégation du signe non mendélienne (voir figure 31). L'analyse ne nous donne jamais 2 a et 2 α par tétrades, pour de nombreux ascospores aucun signe n'a pu être identifié. Ces ascospores ne forment aucune figure de zygote en mélange avec des levures haploïdes de signe connu et cela même après 36 heures d'incubation du mélange. Les figures de sporulation très facilement obtenues sont sans doute dues à une diploïdisation très rapide lors de la germination des ascospores. De plus, le ségrégeant 101-50 a la taille d'une levure diploïde, présente parfois des formes anormales, a une croissance très lente et très irrégulière. Ces différentes observations sont caractéristique d'une levure aneuploïde.

Ségrégeants de la levure 208.

- 208-1 x yeast foam a : 4 zygotes isolés viables - bonne sporul. - pas d'asque à 4 spores.
- 208-2 x yeast foam a : 7 zygotes viables - bonne sporulation - asques à 4 spores - 48 ascospores isolés, seuls 5 sont viables.
- 208-3 x yeast foam a : 5 zygotes viables isolés - aucune sporul.
- 208-4 x yeast foam a : 7 zygotes viables isolés - bonne sporul. asques à 4 spores - 36 ascospores isolés, aucun n'est viable.
- 208-8 x yeast foam a : 4 zygotes viables isolés - aucune sporul.
- 208-11 x yeast foam a : 8 zygotes isolés viables - bonne sporul.

asques à 4 spores - 8 ascospores isolés, un seul est viable.

208-14 x yeast foam $\times$: 3 zygotes viables isolés - pas de sporul.

208- 20 x yeast foam a : 5 zygotes viables isolés - un seul zygote sporule, pas d'asques à 4 spores.

208-21 x yeast foam a : 3 zygotes viables isolés - aucune sporul.

Vu la mauvaise viabilité des ascospores, aucune analyse génétique n'a été possible pour les ségrégeants de la levure 208.

4.3.5 - Conclusions et discussion de la troisième partie.

Si nous appliquons les techniques mises au point dans les laboratoires de génétique aux levures industrielles et plus particulièrement aux levures de brasserie, différentes difficultés sont rencontrées. Ces difficultés nous ont conduit à conclure que dans l'état actuel, il est impossible d'isoler une levure haploïde à partir d'une levure de brasserie. Des levures haploïdes ont pu être isolées par Emeis (1965) à partir d'une levure " sauvage " tétraploïde, c'est-à-dire une levure non utilisée dans l'industrie , au moyen de deux sporulations successives.

Envisageons maintenant les difficultés rencontrées dans l'étude génétique des levures de brasserie :

1°/ mauvaise sporulation des levures industrielles .

Seules les levures de fermentation haute ou *S. cerevisiae* sporulent. Les levures de fermentation basse ou *S. carlsbergensis* à deux exceptions près dont une ne serait pas une levure de brasserie mais une levure d'infection, ne sporulent jamais. De plus parmi les levures hautes, 21% seulement sporulent convenablement et présentent des asques avec 4 spores. Seules 10 souches parmi les 48 souches analysées pourraient donc convenir pour une analyse génétique. Fowell(1969) signale qu'une conservation longue de la levure sur

des milieux artificiels, comme ici le moût de brasserie, provoquerait la perte de la faculté de se reproduire sexuellement et donc de sporuler.

2°/ mauvaise viabilité des ascospores isolés.

La viabilité des ascospores était tellement mauvaise (5 ascospores viables / 63 ascospores isolés) que nous avons dû abandonner la micromanipulation comme technique d'isolement. La mauvaise viabilité des ascospores peut s'expliquer soit par une ploïdie impaire ($3n$ ou $5n$) soit par une aneuploïdie (nombre de chromosomes incomplet), soit par un gène léthal de la levure de départ. La technique d'isolement en masse (Emeis 1958) permet d'obtenir des ascospores viables en grand nombre.

3°/ absence de signe des ascospores viables isolés.

Pour la levure 101, 73% des ascospores présentent soit des formes anormales (celles-ci ressemblent aux formes des zygotes et par conséquent la détermination du signe est impossible), soit ne forment pas de zygote avec les levures haploïdes de signe connu. Parmi les 27% restants, la moitié des ascospores ne conjuguent pas avec les levures " tester" haploïde yeast foam, mais avec des ségrégeants isolés à partir de la levure 101 et qui sont de signe contraire. Cette absence de signe avec les levures haploïdes yeast foam pourrait être due à des compositions différentes des parois cellulaires des levures " yeast foam " et des levures industrielles. Parmi les ascospores conjuguant avec les levures haploïdes " yeast foam " , nous obtenons trois fois plus d'ascospores viables de signe α que de signe α . La levure de brasserie 101 aurait donc suivant les travaux d'Emeis (1958), la formule $aa\alpha$. Vu le grand nombre d'ascospores non viables et d'ascospores avec une forme anormale, nous pouvons dire que la levure 101 ne possède pas un jeu complet de chromosomes et serait

une aneuploïde.

Les levures 192 et 185 donnent très peu d'ascospores avec un signe. Pour la levure 208, 22 ségrégeants avec un signe ont pu être isolés : 20 de signe α et 2 de signe a.

4°/ analyse génétique impossible des ségrégeants possédant un signe.

Cette analyse est impossible pour les raisons suivantes :

- le zygote formé entre le ségrégeant et une levure haploïde de signe connu est souvent non viable.
- lorsque le zygote est viable et que nous plaçons celui-ci sur milieu de Fowell, la sporulation est nulle ou mauvaise (pas d'asques à 4 spores).
- lorsque la sporulation du zygote est bonne, la dissection des asques à 4 spores à l'aide de la micromanipulation conduit à des ascospores non viables.
- nous avons pu obtenir 4 ascospores viables par tétrades avec un seul hybride : 101-50 x yeast foam a. Dans ce cas aussi des anomalies sont apparues. Beaucoup des ascospores resporulent. Nous n'obtenons pas 2 a et 2 α par tétrades, par conséquent la ségrégation du signe est non mendélienne. De plus , ce ségrégeant 101-50 a la taille d'une levure diploïde, une croissance très lente et présente parfois des formes anormales.

Nous ne pouvons donc pas considérer le ségrégeant 101-50 comme une levure haploïde. Le fait que nous n'avons pas pu isoler de levures haploïdes est également une preuve que la levure 101 est aneuploïde. Si la levure 101 était une triploïde de formule aa α , nous devrions avoir parmi les ségrégeants isolés quelques levures haploïdes, peut être peu nombreuses à côté de nombreux ségrégeants aneuploïdes.

5- CONCLUSIONS GENERALES.

La synthèse et l'activité des enzymes cataboliques et plus particulièrement celles du catabolisme des hydrates de carbone sont réglées par la répression catabolique, la répression transitoire et l'inhibition catabolique (Paigen et William 1970). La répression catabolique chez la levure se traduit notamment par un arrêt ou une synthèse réduite de l'alphaglucosidase (Van Wijk 1968), des enzymes du cycle de krebs et de celles effectuant le transport d'électrons (Bartley 1962- Polakis 1965) en présence de glucose. L'inhibition catabolique contrôle l'activité de la perméase du maltose(Görts 1969) et de l'isocitritase (Chapman 1968). Dans ce cas le glucose ou un produit du métabolisme du glucose inhibe l'activité de l'enzyme déjà synthétisée.

les travaux de Ullmann et Monod 1968, de Perlman et Pastan 1969 ont montré chez E.Coli l'importance du 3-5AMP cyclique dans la régulation de la répression catabolique et transitoire. Le 3-5 AMP cyclique est capable de lever les deux répressions. Le taux intracellulaire de ce produit est contrôlé par l'activité de l'adényl cyclase qui synthétise l'AMP cyclique, par l'activité de la phosphodiesterase qui transforme le 3-5 AMP cyclique en 5' AMP (produit inactif) et par l'excrétion du 3-5 AMP cyclique dans le milieu. A l'aide de mutants, (Schwarts- Beckwith 1970) ont pu montrer que la répression agirait au niveau du promoteur. La transcription à partir du promoteur pour les opérons sensibles à la répression catabolique ne se fait qu'en présence de 3-5 AMP cyclique, tandis que pour les opérons insensibles à cette répression, la transcription ne dépend pas de la présence d'AMP cyclique(Zubay et Lederman 1969).

L'AMP cyclique se combine avec son récepteur intracellulaire qui est une protéine appelée protéine CAP et active le promoteur. La synthèse du RNA messenger commence grâce à la RNA polymérase. Si le répresseur s'attache à l'opérateur, la transcription ne se fait pas même en présence d'AMP cyclique et de la protéine CAP.

Quelques travaux ont vérifié toutes ces notions établies avec *E.Coli* chez la levure. Cheung (1966) a décelé de l'AMP cyclique chez *S.carlbergensis*. Van Wijk (1971) a trouvé des concentrations intracellulaires en AMP cyclique six fois plus faibles en croissance sur glucose qu'en croissance sur galactose. La répression catabolique s'exprime pour ces deux substrats par une différence d'activité de dix fois pour l'alpha-glucosidase et de six fois pour la succinique déshydrogénase. Sy et Richter (1972) montrent que la concentration en AMP cyclique et en adényl cyclase atteint une valeur maximum en fin de croissance sur glucose. Nous assistons dans ces conditions à une dérépression des enzymes respiratoires.

Les observations concernant la répression et l'inhibition catabolique sont souvent limitées à un nombre restreint de levures. Or nous savons que les levures de brasserie (Haboucha et Masschelein 1960- Harris et Millin 1963) présentent des sensibilités différentes aussi bien à la répression catabolique des enzymes respiratoires qu'à celle de la maltozymase. L'emploi de levures industrielles présentent cependant des inconvénients pour l'étude des phénomènes au niveau génétique. En effet, ces levures sont des organismes complexes, peu connus et polyploïdes (Emeis 1958- 1965).

Par une étude génétique, nous avons tenté de connaître la ploïdie des levures de brasserie et d'isoler quelques levures haploïdes à partir de ces levures polyploïdes.

Ces levures haploïdes pourraient servir à la fabrication de mutants qui permettraient d'étudier les mécanismes de la répression et de l'inhibition catabolique. En effet, Schwartz et Beckwith (1970) à l'aide de mutants ont pu montrer que la répression catabolique se fait chez *E.Coli* au niveau du promoteur. Foury et Goffeau (1972) sont parvenus à isoler des mutants de *Schizosaccharomycès pombe* présentant une réponse modifiée à la répression catabolique. Nous n'avons pas pu isoler des levures haploïdes pour les raisons suivantes :

1°/ La plupart des levures industrielles ont perdu la faculté de sporuler. Seules les levures hautes ou *S.cerevisiae* sporulent, les levures basses ou *S.carlsbergensis* ne sporulent jamais. De plus parmi, les 48 souches de *S.cerevisiae* analysées, seules 10 souches sporulent convenablement et présentent des asques à 4 spores.

2°/ La viabilité des ascospores est très mauvaise : 5 ascospores viables / 63 isolés. Ce phénomène peut s'expliquer soit par une ploïdie impaire ($3n$ ou $5n$), soit par une aneuploïdie (nombre de chromosomes incomplets), soit par un gène léthal possédé par la levure de départ.

3°/ Les ascospores viables isolés ne conjuguent pas avec une levure haploïde " tester " de signe connu : absence de signe pour 73% des ascospores de la levure *S.cerev.* 101.

Pour la levure 101, parmi les ascospores possédant un signe, trois fois plus d'ascospores de signe a que de signe α sont obtenus.

La levure 101 aurait donc la formule $aa\alpha$.

Pour les levures *S.cerev.* 185 et 192, très peu d'ascospores avec un signe ont pu être obtenus.

Pour la levure *S.cerev.* 208 22 ségrégeants : 20 de signe α et 2 de signe a ont été isolés.

4°/ L'analyse génétique des ségrégeants possédant un signe est impossible. En effet, le zygote formé entre le ségrégeant et la levure "tester" est souvent non viable. S'il est viable, sa sporulation est mauvaise. Lorsque le taux de sporulation est suffisant, les 4 ascospores isolés à l'aide de la micro-manipulation ne sont pas viables ou s'ils sont viables 2a et 2x ne sont pas obtenus par tétrades. La ségrégation du signe est donc non mendélienne.

Toutes ces observations nous ont amené à conclure que les levures de brasserie étudiées sont de ploïdie impaire $3n$ ou $5n$ et aneuploïde (nombre de chromosomes incomplets). En effet, si les levures étaient simplement de ploïdie impaire, nous devrions avoir parmi les ségrégeants isolés quelques levures haploïdes, peut-être peu nombreuses à côté de nombreux ségrégeants aneuploïdes.

Deux cas de répression et d'inhibition catabolique ont été étudiés dans ce travail chez les levures de brasserie. Ce sont la répression des enzymes respiratoires et celle de la maltozymase. Le taux de répression aussi bien des enzymes respiratoires que de la maltozymase varie considérablement d'une souche à l'autre. De plus, l'effet du glucose dépend de la concentration utilisée, en dessous de 0,1%, nous assistons à une dérépression des enzymes respiratoires, alors que le glucose est répresseur pour les deux systèmes à des concentrations plus élevées que 0,2%. Se basant sur l'action du glucose sur ces deux systèmes enzymatiques, Görts (1967) et Van Wijk (1968) observent une corrélation entre répression et dérépression des enzymes de la respiration et de la maltozymase. Ils en concluent qu'il pourrait y avoir un mécanisme commun pour la régulation de ces deux groupes d'enzymes.

Pour mettre à l'épreuve cette hypothèse avec les

levures de brasserie, nous avons effectué une étude comparée de la répression des enzymes respiratoires et de la maltozymase chez les différentes souches de *S. cerevisiae* et *carlsbergensis*. Si une corrélation existe entre répression des enzymes respiratoires et de la maltozymase, le degré de répression doit être identique pour les deux systèmes chez les différentes levures étudiées. Pour les enzymes de la respiration, la répression est très faible dans le cas d'une croissance sans diauxie. Un arrêt prolongé de la croissance après épuisement du glucose et un temps de génération élevé sur éthanol indiquent par contre une sensibilité élevée des enzymes respiratoires à la répression catabolique. Pendant la diauxie comme l'ont montré les travaux de Strittmatter (1957), Haboucha (1960), Polakis (1964), Bartley (1966), Beck (1968) et les résultats exposés dans ce travail, il se produit une synthèse des enzymes du cycle de Krebs, de celles effectuant le transport d'électrons et des enzymes du shunt glyoxylique.

La diauxie est inexistante chez tous les *S. cerevisiae* étudiés, elle existe cependant chez certains *S. cerev.* (Polakis 1965- Görts 1969). La durée de la diauxie est courte chez certains *S. carlsbergensis* : levures 306- 311 et 339, elle est longue chez d'autres : levures 167- 337- 338- 340 et 350. Pour la maltozymase, les enzymes sont soit insensibles au glucose : levure *S. carlsb.* 338, soit réprimées (arrêt de la synthèse) par le glucose : levures *S. cerev.* 101- 106 et 173, soit inhibées (arrêt de la synthèse et inhibition partielle de l'activité de l'enzyme préformée) : levures *S. cerev.* 123 et *S. carlsb.* 167- 306 311- 337- 339- 340 et 350.

Pour les levures étudiées, une corrélation entre répression des enzymes respiratoires et de la maltozymase ne semble pas exister.

En effet, chez la levure 338, la maltozymase est insensible au glucose, les enzymes respiratoires et du shunt glyoxylique sont fortement reprimées : 7h de diauxie. Le cas inverse se produit pour les levures *S.cerev.* 123 et *S. carlsb.* 306- 311 et 339: la répression des enzymes respiratoires est faible (pas de diauxie pour *S.cerev.* 123, diauxie de 1h30 pour *S.carlsb.* 306- 311 et 339), la maltozymase elle est inhibée par le glucose pour ces quatre levures. Même pour une levure comme *S.carlsb.* 167 où la répression est forte aussi bien pour les enzymes respiratoires que pour la maltozymase, une telle corrélation ne peut être observée.

En effet, lors de la croissance sur glucose 0,15%, pendant l'utilisation du sucre par fermentation, le glucose réprime les enzymes respiratoires et dérèprime la maltozymase. Après une diauxie de 8h, la levure croît en oxydant l'éthanol accumulé. L'éthanol induit les enzymes respiratoires(succinique déshydrogénase) et celles du shunt glyoxylique, il réprime par contre la maltozymase. De même lors du passage d'une croissance sur glucose à une croissance sur acétate, les enzymes respiratoires et du shunt glyoxylique sont induits, l'activité de la maltozymase reste inchangée.

Le taux de répression exercé sur les enzymes de la respiration dépend également de la nature de la source hydrocarbonée. Les travaux de Polakis (1964), Görts (1967) et Van Wijk (1968) indiquent que le galactose est un répresseur moins efficace des enzymes respiratoires que le glucose. Nous avons étudié la répression des enzymes respiratoires par le maltose chez *S.carlsb.* 167. Le maltose tout comme le galactose réprime moins fortement les enzymes respiratoires. Pour cette levure, la croissance sur glucose 0,15% se caractérise par une utilisation du sucre par fermentation avec un temps de génération

de deux heures, une diauxie de huit heures et un temps de génération pendant la croissance sur éthanol de dix heures. Sur maltose 0,15% par contre la courbe de croissance présente un simple fléchissement et le temps de génération de cinq heures ne varie pas pendant toute la durée de la croissance. Avec le maltose 2%, l'allure de la croissance est semblable à celle obtenue avec le glucose 0,15%. Des mesures de la capacité respiratoire montrent en croissance sur 0,15% de maltose une adaptation plus rapide à la respiration de l'éthanol, des valeurs élevées sont obtenues avant la diauxie alors que le maltose n'est pas complètement utilisé (il en subsiste 0,075%). Avec le maltose 2% par contre, l'adaptation à la respiration de l'éthanol se produit pendant la diauxie. La perméase du maltose n'est pas saturée avec 0,15% de maltose ce qui expliquerait une vitesse de croissance plus lente et un Contr'Effet Pasteur moins marqué. Les quantités de maltose résiduel subsistant tout au cours de la croissance sur maltose 0,15% empêchent une dérépression totale de la succinique déshydrogénase et des enzymes du shunt glyoxylique. En effet, les valeurs trouvées pour ces enzymes au cours de la deuxième phase exponentielle sont plus faibles en croissance sur maltose 0,15%, comparées à celles de cellules récoltées dans les mêmes conditions en croissance sur maltose 2% ou glucose 0,15%.

Plus la source hydrocarbonée est utilisée rapidement, plus forte sera son effet répresseur sur les enzymes sensibles à la répression catabolique. Le maltose tout comme le galactose seront donc des répresseurs moins efficaces des enzymes respiratoires que le glucose, en effet, le temps de génération est de 2 heures sur glucose et de 5 heures en croissance sur maltose pour *S. carlsb.* 167. Pour la levure *S. cerev.* 77 de Nutfield utilisée

par Tustanoff et Bartley (1964), le temps de génération sur glucose est de 1,1 heures et sur galactose de 1,7 heures. Ce Contr'Effet Pasteur moins marqué serait du à une accumulation moindre de métabolites inhibiteurs par suite de la croissance plus lente.

Contrairement aux travaux de Görts (1969) et de Van Wijk (1968), l'éthanol produit chez la levure *S.carlsb.* 167 une répression très forte de la maltozymase : la synthèse et l'activité de l'enzyme préformée sont inhibées et cela aussi bien pour la perméase du maltose que pour l'alphaglucosidase . Avec le glucose, seule l'activité de la perméase du maltose est inhibée. Cette inhibition catabolique exercée par l'éthanol sur la synthèse et l'activité de la maltozymase explique certains résultats différents trouvés par Van Wijk, Görts et dans ce travail. Pour la levure *S.cerev.* Hansen utilisée par Görts (1969), l'éthanol est sans effet sur l'activité de la maltozymase. Avec la *S. carlsb.* NCY74 employée par Van Wijk ,l'éthanol est inducteur. Cette réponse différente obtenue pour l'éthanol explique les résultats au cours de la croissance sur glucose. Les résultats de Görts montrent pour *S.cerev.* Hansen une répression de la maltozymase lors de l'utilisation du sucre par fermentation et une dérépession lors de la croissance sur éthanol. Pour la levure *S.carlsb.* 167, la situation inverse est observée : dérépession lors de l'utilisation du glucose 0,15% et répression lors de l'oxydation de l'éthanol. Van Wijk explique la dérépession de l'alphaglucosidase par une diminution du pool des métabolites inhibiteurs, ceux-ci étant utilisés par les enzymes du cycle de Krebs dont l'activité est élevée pendant la deuxième phase exponentielle. L'effet répresseur de l'éthanol serait donc essentiellement variable d'une souche à l'autre. Il serait

daillleurs intéressant de vérifier si cet effet répresseur se retrouve également pour les autres souches de levures industrielles utilisées dans ce travail. Les métabolites inhibiteurs intervenant dans l'inhibition de la maltozymase ~~pour l'inhibition~~ seraient différents chez *S.carlb.* 167 et chez *S.cerev.* Hansen 1171 ou *S.carlb.* NCY74. Pour ces deux dernières levures, les catabolites inhibiteurs seraient ¹⁶⁷ un intermédiaire ou un dérivé de cet intermédiaire de la chaîne glycolytique du glucose à l'éthanol, alors que pour *S. carlb.*¹⁶⁷, cet inhibiteur se situerait dans la chaîne d'oxydation de l'éthanol.

6 - BIBLIOGRAPHIE.

- 1- Aboud M - Burger M - Bioch. Biophys. Res. Comm. 43 174 1971
- 2- Alvarez A - Vanderwinkel E - Wiame JM- Biochim. Biophys. Acta
28 333 1958
- 3- Aubert JP- Milhaud G - Ann. Inst. Pasteur 90 320 1956
- 4- Azam F - Kotyk A FEBS Letters 2 333 1969
- 5- Barnett JA - Experientia 15 99 1959
- 6- Bechet J- Wiame JM -Biochim. Biophys. Res. Comm. 21 226 1965
- 7- Beck C - Von Meyerburg HK- J.Bact. 96 479 1968
- 8- Blackley ER- Boyer PD - Biochim. Biophys. Acta 16 576 1955
- 9- Brock TD - J. Bact. 75 697 1958
- 10- Burge M - Suomolainen H - Suomen Kemistilehti 38 285 1965
- 11- Burger M - Hejmova L - Kleinzeller A - Bioch. J. 71 233 1959
- 12- Burger M- Bacon E - Bacon JSD - Bioch. J. 78 504 1961
- 13- Chapman C- Bartley W - Bioch. J. 107 455 1968
- 14- Cheung WJ- Biochim. Biophys. Acta 115 235 1966
- 15- Cirillo V - Membr. Transp. and Metabolism p. 343 1960
- 16- Cirillo V - ANN. Rev. Micr. 15 197 1961
- 17- Cirillo V- Regul. chez les microorg. p.371 Kleinzeller et
Kotyk 1968
- 18- Cohen GN- Monod J - Bact. Rev. 21 169 1957
- 19- Cook AH- Phillips AW- Arch. Bioch. Biophys. 69 1 1957
- 20- Croes AF - Planta 76 227 1967
- 21- De Deken RH- J.Gen. Microb. 44 149 1966
- 22- De Kroon RA- Koningsberger VV- Biochim. Biophys. Acta 204 590 1970
- 23- Dixon - Kornberg HL - Bioch. J. 72 38 1959
- 24- Eaton NR - Klein HP - Bioch. J. 67 373 1957
- 25- Emeis CC- Naturwissenschaft 45 441 1958
- 26- Emeis CC - Thèse technischen Universität Berlin 1965

- 27- Ennis HL- Lubin M - Science 146 1475 1964
- 28- Ephrussi B- Slonimski P - Yotsuyanagi Y - Tavlitki J -
CR Lab. Carlb. 26 87 1956
- 29 - Ferguson JJ- Boll M- Holzer H - Eur. J. Bioch. 1 21 1967
- 30- Foury F - Goffeau A - Biochim. Biophys. Res. Comm. 48 153 1972
- 31- Fowell RR - Nature 170 578 1952
- 32- FowellRR- Moorse ME - J. Appl. Bact. 23 53 1960
- 33- Fowell RR - J. Appl. Bact. 30 450 1967
- 34- Fowell RR - The Yeasts vol. 1 p. 469 - Rose et Harrisson
Acad. Press.
- 35- Friss J - Ottolenghi P - CR Lab. Carl. 31 272 1959
- 36- Ganedo C - J. Bact. 107 401 1971
- 37- Gascon S - Neuman NP - Lampen JO - J. Biol. Chem. 243 1567 1968
- 38- Gjertsen P - J. Inst. Brew. 59 296 1953
- 39 - Gjertsen P - Eur. Brew. Conv. Baden Baden p. 37 1955
- 40- Görts CPM - Antonie Van Leeuwenhoek J. 33 451 1967
- 41- Görts CPM - Antonie Van Leeuwenhoek J. 35 253 1969
- 42- Görts CPM - Biochim. Biophys. Acta 184 299 1969
- 43- Görts CPM - Antonie Van Leeuwenhoek J. 37 161 1971
- 44- Haboucha J- Masschelein ChA- Devreux A - Proc. Eur. Brew.
Conv. p. 157 1960
- 45- Haboucha J- Masschelein ChA - Biochim. Biophys. Acta 38 1 1960
- 46- Hall RD- Harris G - Mac Williams IC - J. Inst. Brew. 57 264 1951
- 47- Halvorson H - Ellias - Biochim. Biophys. Acta 30 28 1958
- 48- Halvorson HO- Winderman S- Gorman J- Biochim. Biophys. Acta
67 42 1963
- 49- Harris G- Barton Wright EC - Curtis NS- J. Inst. Brew. p. 264 1951
- 50- Harris G- Mac williams IC- Phillips AW - Proc. Eur. Brew. Conv.
1957 p. 173
- 51- Harris G- Thompson CC - J. Inst. Brew. 66 293 1960
- 52- Harris G - Thompson CC - Biochim. Biophys. Acta 52 176 1961

- 53- Harris G - Millin DJ - Biochim. J. 88 89 1963
- 54- Harris G- Millin DJ - Eur. Brew. Conv. p. 400 1963
- 55- Harris G- Watson W - J. Inst. Brew. 73 274 1966
- 56- Hauge JC- Mac Quillan AM - Cline AL - Halvorson HO-
Biochim. Biophys. Res. Comm. 5 267 1961
- 57- Hawthorne DC - Mortimer RK - Genetics 45 1085 1960
- 58- Hawthorne DC - Genetics Princeton 48 176è 1963
- 59- Hawthorne DC- Mortimer RK - Genetics 53 165 1965
- 60- Heredia CF- Sols A - De la Fuente G - Eur. J. Bioch. 5 321 1968
- 61- Hermann A- Roman H - Genetics Princeton 53 727 1966
- 62- Hilger F - Mémoire de licence spéciale ULB- Lab. Micr. 3 p. 32
1969
- 63- Hopkins RH - Kulka D- Proc. Eur. Brew. Conv. p. 182 1957
- 64- Johnson MJ - Science 94 200 1941
- 65- Johnson - Mortimer RK - J. Bact. 78 292 1959
- 66- Kerridge D - J. Gen. Microb. 19 497 1958
- 67- Khan NA - Eaton N - Biochim. Biophys. Acta 146 173 1967
- 68- Kornberg HL - Krebs FRS - Nature 179 988 1957
- 69- Kornberg HL - Biochim. Biophys. Acta 89 381 1964
- 70- Kornberg HL - Biochim. Biophys. Acta 123 654 1966
- 71 - Krebs HA- Gurin S - Eggleston LW - Biochim. J. 51 614 1952
- 72- Kreger Van Rij NJW- Lodder J - The Yeast p. 131- N.H Publ. CO
- 73- Lederberg J.- Lederberg EM - J. Bact. 63 399 1952
- 74- Lindegren CC - Lindegren G - Proc. Nat. Acad. Sc. USA 29 306 1943
- 75- Lindegren CC - The Yeast Cell, its genetics and cytology 1952
- 76- Linnane AW- Still JV - Arch. Bioch. Bioph. 59 383 1955
- 77- Linnane AW- Vitols - J. Cell. Biol. 13 345 1962
- 78- Lowry - J. Biol. Chem. 193 265 1951
- 79- Lutkins HB - Than SH - Wallace PC- Linnane AWX- Biochim.
Biophys. Res. Comm. 23 363 1963
- 80- Lynen F - Justus liebig's Ann. Chem. 546 120 1941
- 81- Mac Farlane W - Held HR - Am. Soc. Brew. Chem. 67 78 1953

- 82- Mac Quillan AM - Halvorson HO - J. Bact. 84 23 1962
- 83- Mac Quillan AM- Halvorson HO - J. Bact. 84 3m 1962
- 84- Magasanik B - Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.
26 193 1961
- 85- Masschelein ChA- Jeunehomme-Ramos C -Jenard H - Haboucha J -
Devreux A - Proc. Eur. Brew. Conv. p. 381 1963
- 86- Masschelein ChA - Thèse Doctorat Nancy 1965
- 87- Mehl - J. Biol. Chem. 157 173 1944
- 88- Millin DJ - J. Inst. Brew. 69 309 1963
- 89- Mortimer RK - Hawthorne DC - Ann. Rev. Micr. 20 151 1966
- 90- Niefind HJ- Proc. Reunion groupe Micr. E.B.C varèse 1970
- 91- Nurminen T - Suomolainen H- J. Gen. Micr. 53 275 1968
- 92- Olson JA - Nature 174 695 1954
- 93- Olson JA - Fed. Proc. 16 229 1957
- 94- Paigen K - William B - Adv. in Micr. Phys. p. 252 1970
- 95- Perlman R - Pastan I - Bioch. Biophys. Res. Comm. 37 151 1969
- 96- Phillips AW- J. Inst. Brew. 61 122 1955
- 97- Phillips AW - Arch. Bioch. 80 346 1959
- 98- Polakis ES - Bartley W - Beck GA - Bioch. J. 90 369 1964
- 99- Polakis ES- Bartley W - Bioch. J. 97 284 1965
- 100- Polakis ES - Bioch. J. 97 290 1965
- 101- Raper JR- " Sex in Microorganisms " DH Wenrich - IF Lewis
et JR Raper - Am. Ass. of the Adv. Sc. Publ. n°37 Washing.
- 102- Robertson JJ- Halvorson HO - J. Bact. 73 186 1957
- 103- Robinson HW- Hodgen - J. Biol. Chem. 135 1940
- 104- Ruiz-Amil M- Torrontegui G- Palacian E- Castaliva L- Losada M
J. Biol. Chem. 240 3485 1965
- 105- Schatz- Tuppy - Z. Naturf. 18 b 145
- 106- Schwarts D- Beckwith J " The lactose operon " Cold. Spring
Harb. U.S.A
- 107- Seifter S- Seymour S - Novic B- Muntwyler E - Arch. Bioch.
25 191 1950

- 108- Siegel MR- Sisler HD- Biochim. Biophys. Acta 87 70 1964
- 109- Singer B - Meth. Bioch. Anal. IV 307 1957
- 110- Sols A - Biochim. Biophys. Acta 20 62 1956
- 111- Sols A - " Aspects of Yeast Metabolism " p.44- AK Mills -
HA Krebs - Blackwell Sc. Publ. Oxford 1967
- 112- Somlo M- Fukuhara H - Bioch. Bioph. Res. Comm. 19 587 1965
- 113- Speziali GAG- Van Wijk R - Bioch. Bioph. Acta 235 4666 1971
- 114- Stadman ER- Meth. in Enz. 3 931 1956
- 115- Strittmatter CF- J. Gen. Microb. 16 169 1957
- 116- Suomolainen H - Biochim. Bioph. Acta 20 319 1956
- 117- Sutton DD- Lampen JO - Biochim. Bioph. Acta 56 303 1962
- 118- Swanson WH- Clifton CE - J. Bact. 56 115 1948
- 119- SY J.- Richter D - Bioch. 11 2788 1972
- 120- Taylor NW - J. Bact. 87 863 1964
- 121- Taylo NW - Arch. Bioch. Biophys. 111 181 1965
- 122- Taylor NW- Orton WL- Badcock GE- Arch. Bioch. Biophys.
123 265 1968
- 123- Tustanoff ER- Bartley W - Bioch. J. 84 40 P 1962
- 124- Tustanoff ER- Bartley W - Bioch. J. 91 595 1964
- 125- Ullmann A - Monod J- FEBS letters 2 57 1968
- 126- Ullmann A - Biochimie 53 3 1971
- 127- Umbreit ww- Burris RH- Stauffer JF- Manometric Techniques
Burgess Pu. CO.
- 128- Utter - " Aspects of Yeast Metabolism " p. 199- AK Mills-
HA Krebs - Blachwell Sc. Pu. Oxford 1967
- 129- Vanderwinkel E - Thèse Doctorat CERIA Inst. Recherch. 1960
- 130 - Van Wijk R - Kon. Ned. Akad. Wetensch. 71 p. 60-72-137-293
1968
- 131- Van Wijk R- Biochim. Biophys. Acta 186 178 1969
- 132 - Van Wijk R- Konijn TM - FEBS letters 13 184 1971
- 133- Van Wijk R - Van Rijn J- J. Bact. 110 477 1972
- 134- Wiame JM- Adv. in Enz. 18 241 1957

- 135- Winge O - Lautsen O- CR Lab. Carl. S. Phys. 22 9 1937
136- Winge O- Roberts C - CR Lab. Carl. 24 341 1949
137- Winge O - Roberts C - CR Lab. Carl. 25 419 1950
138- Yayaraman J- Cotman C- Mahler HR- Sharp CW- Arch. Bioch.
Bioph. 116 224 1966
139- Yotsuyanagi - J. Ultrastruct. Res. 7 121 1962
140- Yudkin MD - Bioch. J. 123 579 1971
141- Zubay G- Lederman M - Proc. Nat. Acad. Sc. USA 62 550 1969
142- Zubay G- Schwarts D - Beckwith J- Proc. Nat. Acad. Sc. US
66 104 1970
-

